

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração - Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS DE QUITOSANA E ALGINATO CONTENDO
FOSFATO HIDROGENADO DE ZIRCÔNIO, SÓDIO E PRATA**

Ana Kelly Girata

Autora

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Orientadora

*Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.*

Campinas – São Paulo

Abril - 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

G441d Girata, Ana Kelly
Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato
contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata /
Ana Kelly Girata. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Prata. 4. Membranas
(Tecnologia). 5. Ferimentos e lesões. I. Moraes, Ângela
Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Development of chitosan-alginate wound dressings containing
silver sodium hydrogen zirconium phosphate

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Alginates, Silver, Membranes (Technology),
Wounds and injuries

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Alejandro Darío Sosnik, Marisa Masumi Beppu

Data da defesa: 28/04/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Ana Kelly Girata e aprovada em 28 de Abril de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dra. Ângela Maria Moraes

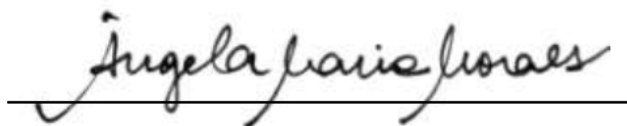


Prof. Dr. Alejandro Darío Sosnik



Prof.^a. Dra. Marisa Masumi Beppu

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, reading "Ângela Maria Moraes", is positioned above a solid horizontal line.

Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

AGRADECIMENTOS

À *Professora Dra. Ângela Maria Moraes* pela oportunidade deste trabalho e, principalmente, pela orientação, confiança, dedicação e amizade sempre presente em todos os dias da nossa vivência.

Às minhas inspirações de vida: *Gabriel* e *Natalina*. Muito obrigada por me ensinarem valores que um ser humano pode ter de melhor: moral, caráter e integridade. Muito obrigada por sempre terem me dado tudo do melhor mesmo nos dias mais difíceis. Obrigada por serem meus pais. Eu me orgulho muito disso.

Ao *Yuji* pelo amor, dedicação, paciência, preciosa amizade e, por acreditar em mim especialmente nesta etapa da minha vida. Obrigada por me ensinar todos os dias a ser uma pessoa melhor. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado e me incentivar a lutar pelos meus sonhos.

A *toda a minha família* pelo apoio e carinho, especialmente ao meu primo *Eiji* pela companhia diária e muitas risadas. Tê-los por perto faz toda a diferença.

A *todos os amigos* pelo carinho, amizade e orações. Especialmente, a *Fabi* e ao *João* que sempre estiveram presentes mesmo distantes e aos amigos *Nemailla* e *Walter* pelo companheirismo e por alegrar meus dias de trabalho.

A todas as pessoas dos laboratórios que participaram e ajudaram a realizar este trabalho. Em especial, agradeço à *Cecilia* que, com toda a paciência, sempre me ensinou e aconselhou desde o primeiro dia que iniciei minhas atividades no laboratório.

Aos professores *Dr. Everson Alves Miranda* e *Dra. Sônia Maria Alves Bueno* pelo uso das dependências de seus laboratórios.

Aos *funcionários* da Faculdade de Engenharia Química que colaboraram para a realização deste trabalho.

À empresa *LM Farma Indústria e Comércio Ltda* pela parceria, oportunidade, apoio e conhecimento técnico recebido e à empresa *Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda* pela esterilização das membranas.

À *CAPES* que, pelo apoio financeiro, viabilizou os frutos deste trabalho.

*“Quão maravilhoso é não ter que esperar para
começar a fazer um mundo melhor”
Anne Frank*

RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo obtido pela desacetilação da quitina e o alginato, um biopolímero extraído de algas. Ambos são atóxicos, biocompatíveis e facilitam a cicatrização de feridas. Por estas razões, podem ser empregados para a produção de curativos para o tratamento de lesões de pele. Além disso, muitos curativos têm incorporado compostos contendo prata para a prevenção e o controle de infecções bacterianas. Diante disso, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologia de produção de membranas constituídas por quitosana e alginato contendo um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada (AlphaSan[®] RC2000) para aplicação na terapia de lesões de pele. As membranas produzidas foram caracterizadas quanto à morfologia de superfície, à espessura, à absorção de fluidos, à perda de massa quando em contato com diferentes fluidos, à capacidade de drenagem de água, à resistência mecânica, à citotoxicidade a fibroblastos, ao desempenho quanto à atividade antimicrobiana, à sensibilidade e irritabilidade dérmica. Os resultados mostraram que o aumento da quantidade de fármaco causa o aumento da opacidade e da espessura das membranas. A eficiência de incorporação do AlphaSan[®] RC2000 foi de até 99%. As membranas contendo o agente antimicrobiano foram capazes de absorver de 15 g a 42,3 g de fluido por grama de membrana. A maior perda de massa das membranas ocorreu em água e correspondeu a 27,5% em um intervalo de 168 horas. Para a capacidade de drenagem foram obtidos valores na faixa de 4.458 a 7.198g/m²dia. Os valores de resistência à tração variaram de 2 a 9 MPa. As membranas apresentaram eficácia contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, citotoxicidade *in vitro* moderada a fibroblastos e foram classificadas como não irritantes e não sensibilizantes. As membranas foram capazes de liberar até 100% de prata presente em sua estrutura em 168h. O modelo que melhor se ajustou ao perfil de liberação foi o que combinou o modelo de cinética de primeira ordem e o de Lei das Potências. Diante desses resultados sugere-se que as membranas de quitosana-alginato obtidas apresentam bom potencial de uso como curativos na terapia de lesões de pele.

Palavras-chave: quitosana, alginato, prata, infecção bacteriana, lesões de pele, AlphaSan[®] RC2000.

ABSTRACT

Chitosan is a polysaccharide obtained by deacetylation of chitin and alginate is a polymer extracted from algae. Both are nontoxic, biocompatible and facilitate wound healing. Because of these characteristics, these compounds can be employed for the production of dressings to treat skin lesions. Moreover, many dressings incorporate in their composition compounds containing silver, to prevent and control bacterial infections. Thus, this study aimed at developing a methodology for the production of membranes composed of the polysaccharides chitosan and alginate containing an antimicrobial agent based on stabilized silver (AlphaSan[®] RC2000) for application in the therapy of skin lesions. The produced membranes were characterized for surface morphology, thickness, absorption of fluids, mass loss in different fluids, water drainage capacity, mechanical resistance, cytotoxicity to fibroblasts and performance regarding antimicrobial activity. The attained results showed that increasing the amount of drug, the membranes became more opaque and thicker. The efficiency of incorporation of AlphaSan[®] RC2000 was up to 99%. The membranes containing the antimicrobial agent were able to absorb from 15 g to 42.3 g of fluid per gram of membrane. The highest membrane mass loss occurred in water and was correspondent to 27.5% in 168 hours. The water drainage capacity decreased as the concentration of the antimicrobial compound was increased, and values in the range of 4,458 to 7,198g/m²day were obtained. The values of tensile strength ranged from 2 to 9 MPa. The membranes showed efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, moderate *in vitro* cytotoxicity to fibroblasts and were classified as non-irritating and non-sensitizing. The membranes containing the drug were able to release up to 100% of the silver present in its structure in 168h. The model that best fitted the drug release profile consisted of a combination of a first-order kinetic model and of a Power Law model. These results suggest that the alginate-chitosan membranes obtained have good potential to be used as a curative in the therapy of skin lesions.

Keywords: chitosan, alginate, silver, bacterial infection, skin lesions, AlphaSan[®] RC2000.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
NOMENCLATURA.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Estrutura da pele	6
2.2. Lesões de pele.....	7
2.2.1. Queimaduras	7
2.3. Biomateriais	11
2.3.1. Curativos.....	12
2.4. Biopolímeros.....	15
2.4.1. Quitosana.....	16
2.4.2. Alginato	20
2.4.3. Complexos de polieletrólitos de quitosana e alginato	22
2.5. Uso da prata como agente antimicrobiano em lesões dérmicas.....	25
2.5.1. AlphaSan [®] RC2000	28
2.6. Incorporação de fármacos em matrizes poliméricas.....	30
2.7. Liberação de fármacos incorporados em matrizes poliméricas	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Materiais	43
3.2. Metodologias	43
3.2.1. Preparação das membranas de quitosana-alginato contendo AlphaSan [®]	43
3.2.2. Esterilização das membranas.....	46

3.2.3.	Caracterização das membranas.....	46
3.2.3.1.	Avaliação da espessura das membranas	46
3.2.3.2.	Morfologia da superfície e da secção transversal.....	47
3.2.3.3.	Ensaio de absorção de solução de cloreto de sódio e cálcio para curativos	47
3.2.3.4.	Perfil de intumescimento das membranas	48
3.2.3.5.	Avaliação da capacidade de drenagem de água.....	49
3.2.3.6.	Avaliação da perda de massa das membranas expostas a vários fluidos.....	50
3.2.3.7.	Análise das propriedades mecânicas	51
3.2.3.8.	Avaliação de eficiência de incorporação da prata nas membranas	51
3.2.3.9.	Avaliação da cinética de liberação da prata das membranas.....	51
3.2.3.10.	Análise do halo de inibição das membranas.....	53
3.2.3.11.	Citotoxicidade das membranas a fibroblastos	54
3.2.3.12.	Avaliação quanto à irritabilidade e corrosão dérmica	55
3.2.3.13.	Sensibilização dérmica	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1.	Aspecto das membranas.....	60
4.2.	Morfologia das membranas contendo AlphaSan®	61
4.3.	Espessura das membranas.....	64
4.4.	Capacidade de absorção.....	66
4.5.	Perfil de intumescimento de fluidos pelas membranas.....	67
4.6.	Estabilidade das membranas em fluidos.....	72
4.7.	Comportamento quanto à capacidade de drenagem de água	74
4.8.	Avaliação da resistência mecânica das membranas.....	75
4.9.	Eficiência da incorporação da prata nas membranas	77
4.10.	Cinética de liberação da prata incorporada nas membranas	79
4.11.	Análise dos mecanismos de liberação da prata da matriz polimérica de quitosana e alginato.....	82
4.12.	Desempenho quanto à eficácia antimicrobiana	88
4.13.	Desempenho quanto à citotoxicidade in vivo a fibroblastos	89
4.14.	Desempenho quanto à irritação dérmica.....	90

4.15.	Desempenho quanto à sensibilidade dérmica	91
4.16.	Substituição dos polímeros de grau analítico por material de grau farmacêutico	92
5.	CONCLUSÕES	95
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura química da quitosana (a) e suas unidades N-acetil glicosamina (b) e D-glicosamina (c).	16
Figura 2.2 - Estrutura química do alginato, na qual as letras M representam os resíduos de manuronato e G, os resíduos de guluronato (adaptado de Rodrigues, 2008).	21
Figura 2.3 - Efeito do pH no complexo de polieletrólitos formado por quitosana e alginato. Os círculos representam as interações iônicas entre as cargas negativas do alginato e as cargas positivas da quitosana (adaptado de Rodrigues, 2008).	23
Figura 2.4 – Estrutura tridimensional do AlphaSan [®] . M representa os íons metálicos sódio, prata e hidrogênio.	29
Figura 2.5 – Etapas de liberação do fármaco: a) penetração do líquido de dissolução nos poros do sistema matricial; b) difusão do fármaco dissolvido até o exterior da matriz.	34
Figura 2.6 – Alterações observadas nos sistemas matriciais que intumescem e sofrem erosão: 1) matriz no estado seco; 2) início da hidratação, intumescimento da matriz e formação da camada de gel; 3 e 4) aumento da hidratação e intumescimento da matriz, diminuição do núcleo seco e início da erosão das cadeias poliméricas; 5) aumento da erosão das cadeias poliméricas; 6) separação das cadeias poliméricas com liberação do fármaco restante (adaptado de Lopes <i>et al.</i> , 2005).....	35
Figura 2.7 – Configurações dos polímeros no processo de dissolução do fármaco nas matrizes poliméricas: 1) as cadeias poliméricas estão completamente entrelaçadas; 2) rearranjo semi-diluído; 3) rearranjo do tipo diluído.	36
Figura 2.8: Ilustração esquemática do modelo proposto por Higuchi (1961), para o qual C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz seca, C_s é a solubilidade do fármaco na matriz polimérica, e h é a espessura da camada de difusão (adaptado de Paul, 2010).	37
Figura 3.1 – Sistema de produção do complexo polimérico.	44

Figura 3.2 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de água das membranas.....	49
Figura 4.1 - Membranas sem prata (a) e preparadas na presença de 0,05% (b), 0,1%, (c), 2% (d), 0,6, (e), 1,1% (f), 2% (g) de prata. Diâmetro das membranas de cerca de 12 cm.	60
Figura 4.2 - Morfologia de superfície das membranas sem prata (a) e preparadas na presença de 0,05% (b), 0,1% (c), 2% (d), 0,6 (e), 1,1% (f) e 2% (g) de prata.	62
Figura 4.3 - Corte transversal das membranas (a) sem prata e preparadas na presença de (b) 0,05%, (c) 0,1%, (d) 2% (e) 0,6, (f) 1,1% e (g) 2% de prata.....	63
Figura 4.4 – Perfil de intumescimento em água das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10% e (►) 2,00% de prata.	68
Figura 4.5 - Perfil de intumescimento em solução salina das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10% e (►) 2,00% de prata.	68
Figura 4.6 – Perfil de intumescimento em fluido corpóreo simulado das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10% e (►) 2,00% de prata.	69
Figura 4.7 – Perfil de intumescimento em soro fetal bovino das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10% e (►) 2,00% de prata.	69
Figura 4.8 – Perfil de intumescimento em solução PBS das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10% e (►) 2,00% de prata.	70
Figura 4.9 – Perfil de liberação da prata nas membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10%, (►) 2,00% de prata em solução tampão PBS: (a) com retirada e substituição total do meio (b) com retirada e substituição de apenas 7% do meio.	80

Figura 4.10 – Perfil de eluição da prata nas membranas de quitosana e alginato alginato preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◄) 1,10%, (►) 2,00% de prata.	82
Figura 4.11 – Ajuste gráfico dos dados de liberação em PBS para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 0,6% de prata.	83
Figura 4.12 – Ajuste gráfico dos dados de liberação em PBS para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% de prata.	83
Figura 4.13 – Ajuste gráfico dos dados de liberação em PBS para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 2,0% de prata.	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Exemplos de matrizes poliméricas utilizadas na liberação controlada de fármacos.	31
Tabela 3.1: Composição das soluções aquosas empregadas para a preparação das membranas (alginato em água Milli-Q e quitosana em solução aquosa a 2% de ácido acético misturada com acetona na mesma proporção em volume).....	45
Tabela 3.2. Composição iônica do fluido corpóreo simulado e sua comparação com a constituição do plasma humano (Kokubo <i>et al.</i> , 1990).....	47
Tabela 3.3: Modelos matemáticos.	52
Tabela 3.4: Classificação da atividade antimicrobiana de acordo com o halo de inibição do crescimento celular.	53
Tabela 3.5: Classificação dos níveis de citotoxicidade de acordo com a análise do IZ.	54
Tabela 3.6: Graduação para reações de eritema.	56
Tabela 3.7: Graduação para reações de edemas.	56
Tabela 3.8: Classificação dos produtos quanto ao grau de irritabilidade dérmica.	57
Tabela 3.9: Graduação de reações para o teste de sensibilidade dérmica.	58
Tabela 4.1: Espessura das membranas de quitosana e alginato secas e após exposição a água, SS, PBS, FCS e SFB a 37°C por 24 h preparadas na ausência ou presença de prata.	65
Tabela 4.2: Capacidade de absorção de solução de NaCl e CaCl ₂ das membranas livres ou contendo prata em diferentes proporções iniciais.	66
Tabela 4.3: Grau de intumescimento das membranas em água, SS, PBS, FCS e SFB em 24 h. ...	71
Tabela 4.4: Dados de perda de massa em fluidos diversos para membranas contendo concentrações variadas de prata.	72
Tabela 4.5: Capacidade de drenagem de água pelas membranas.	74

Tabela 4.6: Propriedades mecânicas das membranas de quitosana e alginato preparadas na presença ou ausência de prata.....	76
Tabela 4.7: Porcentagem de prata incorporada nas membranas de quitosana e alginato.....	77
Tabela 4.8: Perda mássica de prata após cada etapa do processo de lavagem das membranas. ...	78
Tabela 4.9: Parâmetros da equação de Higuchi (1961) para os dados de liberação <i>in vitro</i> da prata em meio tampão PBS a partir de diferentes formulações de membrana.	85
Tabela 4.10: Parâmetros da equação de primeira ordem para os dados de liberação <i>in vitro</i> da prata em meio tampão PBS.	85
Tabela 4.11: Parâmetros da equação de Korsmeyer <i>et al.</i> (1983) para os dados de liberação <i>in vitro</i> da prata em meio tampão PBS.	86
Tabela 4.12: Parâmetros da equação de Peppas e Sahlin (1989) para os dados de liberação <i>in vitro</i> da prata em meio tampão PBS.	87
Tabela 4.13: Parâmetros do modelo combinado de primeira ordem e de Korsmeyer <i>et al.</i> (1983) para os dados de liberação <i>in vitro</i> da prata em meio tampão PBS.	88
Tabela 4.14: Atividade antimicrobiana das membranas com e sem prata.....	89
Tabela 4.15: Citotoxicidade das membranas com e sem prata a fibroblastos NCTC Clone 929.	89
Tabela 4.16: Graduação das reações dérmicas obtidas nos ensaios de irritabilidade dérmica.	90
Tabela 4.17: Graduação das reações dérmicas obtidas nos ensaios de sensibilidade dérmica.....	91
Tabela 4.18 – Caracterização das etapas do processo da produção de membranas utilizando alginatos e quitosanas de empresas distintas.	93

NOMENCLATURA

A = Área

Abs = Capacidade de absorção de solução de cloreto de sódio e cálcio

AGE = Ácidos graxos essenciais

ASTM = *American National Standards Institute*

C = Concentração do fármaco na solução no tempo t

C₀ = concentração inicial do fármaco na matriz seca

C₁ = Concentração da droga na interface polímero-solução

C_i = Grau de intumescimento

CMC = Carboximetilcelulose

C_s = Solubilidade do fármaco no solvente da matriz

D = Coeficiente de difusão do fármaco no meio de dissolução

FCS = Fluido corpóreo simulado

FDA = *Food and Drug Administration*

FEQ = Faculdade de Engenharia Química

GD = Grau de desacetilação

h = Espessura da camada de difusão

IZ = Índice de zona

K = constante

k = Constante de proporcionalidade de primeira ordem

k' = Constante de integração

K_1 = Constante de proporcionalidade

K_2 = Coeficiente cinética de liberação

K_3 = Coeficiente cinética de liberação relacionado à difusão fickiana

K_4 = Coeficiente cinética de liberação relacionado à difusão não fickiana

K_h = Constante de liberação de Higuchi

K_j = Constante de liberação utilizado no modelo de Higuchi para liberação em duas faces

m = Expoente que caracteriza a cinética de liberação da equação de Peppas e Sahlin (1989)

M_0 = Massa inicial

M_1 = Massa final

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

M_f = Massa final após o período de teste

M_i = Massa úmida no tempo i

M_p = Perda de massa

n = Expoente que caracteriza a cinética de liberação da equação de Korsmeyer *et al.* (1983)

OECD = *Organization for Economic Co-operation and Development*

p = Parâmetros do modelo

PBS = *Phosphate buffered saline*

PEC = Complexo polieletrólito

Q = Massa de fármaco liberado no tempo t

R^2 = coeficiente de correlação

R^2_{ajustado} = coeficiente de correlação ajustado

S = Área sólida acessível à dissolução

s = Número de pontos dos dados da dissolução

SFB = Soro fetal bovino

SS = Solução salina

t = Tempo

TD = Taxa de drenagem

UV = Ultravioleta

V = Volume do fluido de dissolução

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos, o tratamento de feridas sofreu mudanças visando à obtenção dos melhores resultados cicatriciais no menor tempo possível (Blanes, 2004). Já na pré-história vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas. Na Mesopotâmia, elas eram lavadas com água ou leite, e curativos eram realizados com mel ou emplastos de ervas. Lã de carneiro, folhas e cascas de árvores eram utilizadas para sua cobertura. Os egípcios concluíram que uma ferida fechada cicatrizava mais rápido do que aberta, por isso, utilizavam tiras de pano para manter unidas as bordas da lesão. Hipócrates sugeriu que as feridas contusas, caracterizadas por traumatismo das partes moles, hemorragia e edema, fossem tratadas com calor e pomadas para promover a supuração, remover material necrótico e reduzir a inflamação. No início da era cristã, Celsus preconizou o fechamento primário das feridas recentes e o desbridamento de lesões contaminadas anteriormente a sua sutura. Além disso, classificou os diferentes tipos de lesões de pele e deu detalhes do tratamento de cada uma delas. A introdução das armas de fogo nas guerras européias no século 14 levou ao surgimento de novos tipos de feridas de curas mais difíceis, e Ambroise Paré, na Renascença, reformulou seu tratamento. O avanço da química levou à descoberta de compostos a base de cloro e iodo que foram utilizados para limpeza do material usado na manipulação das lesões e da pele nos séculos 18 e 19. Atualmente pretende-se interferir na biologia molecular, abordando a síntese de substâncias envolvidas nos fenômenos cicatriciais.

Embora tenham ocorrido grandes avanços na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular e simultaneamente muito se tenha investido em pesquisa e desenvolvimento de recursos, a incidência de queimaduras tem-se mantido bastante alta, com consequências muito sérias quanto à mortalidade e à morbidade. Com isso, têm-se elevados custos financeiros e profundas consequências sociais sobre os portadores, os quais com frequência desenvolvem sequelas que podem levar à perda de membros e de suas funções, resultando em afastamento do trabalho e de suas atividades normais (Mandelbaum *et al.*, 2003).

Fibras de variados tipos têm sido amplamente utilizadas em curativos devido a propriedades de relevância neste tipo de aplicação, como área superficial elevada, maciez, alta capacidade de absorção de fluidos e facilidade de fabricação de produtos com diferentes características. Fibras feitas a partir fontes naturais, principalmente polissacarídeos, têm sido consideradas particularmente promissoras devido à sua excelente biocompatibilidade, não-toxicidade e potencial de bioatividade (Knill *et al.*, 2004). Dentre os polissacarídeos comumente empregados para este fim, destacam-se a quitosana e ao alginato.

A quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina e apresenta propriedades antimicrobianas (como agente bactericida, bacteriostático, fungicida e fungistático) e cicatrizante (Azevedo *et al.*, 2007). É biocompatível e naturalmente degradada no organismo (o monômero e os oligômeros de glucosamina são substâncias que participam de rotas do metabolismo animal), apresentando a propriedade de formar géis em soluções ácidas fracas, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões fúngicas ou bacterianas.

A quitina e a quitosana vêm despertando grande interesse de cientistas e tecnólogos como materiais poliméricos com aplicações na área biomédica. Estes polissacarídeos, além de apresentarem propriedades biológicas adequadas, ainda têm diversas outras características tecnológica e economicamente relevantes, como por exemplo, a quitina consiste em resíduos da indústria da pesca produzidos a partir do processamento da carapaça dos crustáceos (Dallan, 2005).

O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas, sendo utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia e também na preparação de matrizes poliméricas para a encapsulação de fármacos, macromoléculas e células. Esse material é relativamente inerte, biocompatível, biorreabsorvível e resulta em géis de elevada porosidade com boas propriedades mucoadesivas, sendo relevante sua aplicação na produção de vários dispositivos biomédicos comercialmente disponíveis.

Algumas das propriedades dos dispositivos formados por quitosana e alginato, quando em conjunto, podem ser melhoradas em relação às dos polissacarídeos isolados, observando-se, por

exemplo, maior estabilidade a variações de pH e maior eficiência na liberação controlada de princípios ativos (Wang *et al.*, 2001). Além disso, a associação de alginato a quitosana pode atuar de maneira positiva na absorção dos fluidos das lesões e ainda, reduzir o custo final dos dispositivos.

Vários grupos de pesquisas vêm publicando trabalhos que enfocam o desenvolvimento de matrizes de alginato e quitosana, justamente por sua alta aplicabilidade na área de curativos. Neste contexto, no Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides da FEQ/Unicamp, Rodrigues (2008) desenvolveu metodologias escalonáveis de preparação e efetuou a caracterização de membranas de quitosana e alginato contendo ou não o antibiótico bacitracina, empregando condições controladas de vazão e agitação durante a mistura dos polissacarídeos. Por outro lado, Bueno (2010) estudou a adição de surfatantes bicompatíveis (Tween 80, Span 80 e Pluronic F68) à mistura polissacarídica visando a melhoria da distribuição das cadeias poliméricas, e o uso do reticulante covalente glutaraldeído e dos compostos iônicos CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a fim de melhorar as propriedades mecânicas das membranas de quitosana e alginato para aplicações em feridas de pele.

A cicatrização de feridas de pele, entretanto, depende de vários fatores além do uso de curativos, tais como: causa da lesão, estado nutricional do paciente, nível de manutenção da função das áreas afetadas, cuidados específicos com a área lesada, doenças associadas, além da atitude positiva e cooperação do paciente. O tratamento da ferida deve, além de promover a cicatrização, não permitir maior perda de tecido, promover ótimas condições caso procedimentos cirúrgicos sejam necessários, ser o mais indolor possível e prevenir infecções (Bryant, 1992).

O uso de agentes bioativos diversos tem sido fundamental na prevenção e terapia de infecções. Uma das estratégias que tem ganhado atenção é o uso de metais nobres, sendo a prata o mais utilizado. Atualmente, a prata tem sido aplicada no tratamento de infecções encontradas em queimaduras, feridas abertas e úlceras crônicas (Atiyeh *et al.*, 2007), sendo o composto AlphaSan[®] RC2000 disponível comercialmente empregado para este fim.

O AlphaSan[®] RC2000 é um agente antimicrobiano composto de 10% de prata, sendo praticamente insolúvel em água. Apresenta-se como cristais em forma de cubo, com um tamanho

médio de partícula de cerca de um micrômetro. É constituído por uma rede tridimensional de fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata, com muitas cavidades equidistantes contendo prata. Este material pode permanecer em suspensão de forma estável em misturas viscosas, o que permite, a princípio, que o mesmo possa ser adicionado aos complexos poliméricos formados entre a quitosana e o alginato.

Assim, pelas razões expostas anteriormente, buscou-se neste trabalho explorar o desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo prata na forma de AlphaSan[®] RC2000 para o tratamento de lesões de pele. Para isso, os curativos foram produzidos, esterilizados e caracterizados, e a prata liberada foi quantificada. Destaca-se que para a realização deste trabalho contou-se com o apoio técnico da empresa LM Farma Indústria e Comércio Ltda. (situada em São José dos Campos, SP), empresa esta especializada na produção de curativos e outros produtos de uso clínico.

Em decorrência da realização deste trabalho, teve-se a produção técnico científica de:

- Uma patente, cujo título foi de “Membranas de quitosana e alginato incorporando fármacos”, submetida ao INPI em 19/10/2010 (processo número: 018100039110);
- Um pedido de registro na ANVISA, submetido em 14/03/2011 (número do protocolo: 25352.170781/2011-78);
- Um artigo aprovado para publicação nos anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos.

1.1. Objetivos

Este projeto teve por objetivo geral contribuir para os trabalhos realizados no setor de desenvolvimento de membranas para o tratamento de lesões dérmicas, tendo como objetivos específicos:

- A incorporação do AlphaSan[®] RC2000 como agente antimicrobiano em membranas compostas de quitosana-alginato;
- A avaliação da influência do AlphaSan[®] RC2000 na estrutura e na resistência mecânica das membranas;
- A comparação das características das membranas de quitosana-alginato contendo AlphaSan[®] RC2000 com as de amostras livres desse composto quanto ao comportamento em soluções aquosas;
- A avaliação da atividade microbida residual do AlphaSan[®] RC2000 após sua incorporação nas membranas, da citotoxicidade *in vitro* associada as membranas.
- A análise da irritabilidade e sensibilidade dérmicas das membranas contendo o agente antimicrobiano;
- O estudo cinético de liberação da prata incorporada e a modelagem do perfil de liberação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Estrutura da pele*

A pele corresponde a 15% do peso corporal do ser humano e é um órgão externo que reveste e delimita o organismo. Tem como função principal a manutenção do equilíbrio do organismo com o meio exterior, além de protegê-lo contra as agressões do meio externo, absorvendo parcialmente os raios ultravioletas (UV) e promovendo proteção imunológica e química. Através das glândulas presentes na pele são secretados eletrólitos e água, que atuam na manutenção do equilíbrio hidrolítico. A pele é ainda capaz de sintetizar e metabolizar hormônios como a testosterona, progesterona, estrógenos e glicocorticóides, atuando também no controle da temperatura corpórea, em processos que envolvem vasoconstrição e vasodilatação.

A pele é composta de duas camadas: a epiderme e a derme. Abaixo delas está o tecido subcutâneo, denominado hipoderme ou panículo adiposo (Blanes, 2004). A epiderme é constituída por um tecido epitelial do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, onde as células se multiplicam na camada basal e migram no curso de sua diferenciação para as camadas superiores. Nestas camadas, as células acumulam filamentos de queratina, morrem e passam a ser consideradas “escamas” da matriz protéica, formando uma camada morta e acelular, a camada córnea. Essa região é renovada a cada seis semanas. A derme, por sua vez, é composta por um tecido conjuntivo de natureza frouxa próximo ao epitélio e denso em sua porção mais profunda. No tecido conjuntivo da derme existe uma gama de fibras colágenas e elásticas, além de glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Separando a derme da epiderme existe uma lâmina basal composta, sobretudo de colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos ricos em sulfato de heparan (Junqueira e Carneiro, 2004). Nota-se, portanto, que sua estrutura é bastante complexa, visto que as células da superfície estão constantemente substituídas por células da derme e, quando a pele sofre uma lesão, seu reparo é considerado apenas uma aceleração do processo natural de substituição (Paul e Sharma, 2004).

2.2. Lesões de pele

Uma lesão é definida como a interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica contra o ataque (Blanes, 2004).

Sua classificação constitui importante forma de sistematização, sendo necessária para o processo de avaliação e tratamento. Assim, as feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de reparação do tecido, em agudas e crônicas (Santos, 2000).

As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas no tempo esperado e apresentam frequentemente complicações.

O sistema de classificação por extensão do dano tissular engloba feridas superficiais (limitadas à epiderme), feridas com perda parcial (limitadas à epiderme e à porção superior da derme) e perda total (com destruição da epiderme, derme e tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos).

Outra forma de classificação refere-se às estruturas comprometidas, e consiste na descrição anatômica da profundidade da ferida. Este sistema é adotado para o tratamento de alguns tipos de feridas, como as úlceras por pressão e as queimaduras (Doughty, 1992).

Dentre os tipos de lesões de pele de maior ocorrência destacam-se as queimaduras.

2.2.1. Queimaduras

A queimadura é um tipo de lesão que pode afetar a pele e tecidos mais profundos, podendo ser causada por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. Sua manifestação varia desde uma pequena bolha até formas mais graves capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à gravidade e extensão da lesão. Pode ser classificada de acordo com o

agente causal, a profundidade ou a extensão. Este tipo de lesão é considerado um grande problema não somente pela gravidade quando agudas como também em relação às suas importantes sequelas, que poderão marcar para sempre a vida dos pacientes queimados.

A lesão provocada por uma queimadura pode ser descrita com base na sua profundidade, sendo classificada como de primeiro grau quando é comprometida apenas a epiderme, apresentando eritema (coloração avermelhada da pele ocasionada por vasodilatação capilar, que é um sinal típico da inflamação) e dor; de segundo grau, quando atinge a epiderme e parte da derme, provocando a formação de flictenas (elevação revestida por epitélio contendo líquido e com mais de 1 cm de espessura); e de terceiro grau, quando envolve todas as estruturas da pele, apresentando-se esbranquiçada ou negra, pouco dolorosa e seca. Na escolha do tratamento, deve-se considerar não só a profundidade da lesão, mas também a sua fase evolutiva.

As queimaduras de primeiro grau, dependendo da extensão, geralmente evoluem rapidamente, regenerando-se em até cinco dias, sendo indicado uso de creme hidratante local. A queimadura de segundo grau é classificada como profunda, e a sua evolução depende da graduação de profundidade e da ocorrência ou não de complicações, sendo as infecções uma das causas mais frequentes de piora tanto no âmbito tóxico quanto no sistêmico. As queimaduras de segundo e terceiro graus requerem um processo de desbridamento que consiste na retirada de tecidos desvitalizados. Esse processo pode ser demorado e necessitar de maior intervenção dependendo da profundidade e extensão da queimadura. Queimaduras classificadas inicialmente como de segundo grau podem aprofundar-se se ocorrer coexistência de infecção local.

As lesões resultantes das queimaduras são isquêmicas, como consequência da trombose causada pelo trauma. As queimaduras profundas apresentam trombose em todas as camadas da pele atingidas. A diminuição da oxigenação nesses tecidos dificulta o crescimento dos capilares e a cicatrização da ferida, pois todos os tecidos humanos requerem oxigênio para que se mantenham viáveis. Nas queimaduras profundas há uma grande quantidade de tecidos necróticos, o que facilita o desenvolvimento de infecção, pois esses tecidos fornecem nutrientes para as bactérias que requerem pouco oxigênio para sua sobrevivência, consumindo-o e diminuindo ainda mais a quantidade de oxigênio disponível para os tecidos (Ward e Saffle, 1995).

Monetta (1990) afirma que cuidar de feridas não pode ser um processo automático, consistindo em um exercício científico em que o profissional da área de saúde deve atuar de forma consciente, visando aplicar medidas que possam facilitar o processo de cicatrização. Inicialmente deve ser feita uma limpeza da ferida utilizando água à temperatura ambiente, assepsia rápida e utilização prévia de um analgésico, se necessário. O desbridamento da ferida deve ser efetuado quando partes de tecido necrosado estão presentes, principalmente em queimaduras de terceiro e segundo graus. Esse procedimento pode ser feito por meio de agente tópicos, cirurgia, meios mecânicos (com a utilização de fricção realizada com gaze ou esponja úmidas), o que pode danificar o novo epitélio. Pode-se também utilizar meios biológicos, como a utilização da larva de *Lucilia sericata*, que consome exclusivamente o tecido lesado.

A sulfadiazina de prata a 1% é um dos agentes tópicos mais utilizados no tratamento de queimaduras, com a finalidade de desbridar e combater a infecção local, sendo recomendada em queimaduras de segundo e terceiro graus (Ferreira *et al.*, 2003). Como efeitos colaterais do uso deste composto têm sido relatados episódios de discreta leucopenia (diminuição da quantidade de leucócitos) e de alergias em alguns pacientes (Ward e Saffle, 1995). Além disso são descritos casos de inibição da proliferação de queratinócitos e fibroblastos, retardando a cicatrização da ferida (Lee *et al.*, 2005).

Ferreira *et al.* (2003) recomendam a utilização de sulfadiazina de prata a 1% nos primeiros dias de tratamento da queimadura, enquanto há presença de tecido necrótico ou infecção. Esse agente tópico deve ser aplicado duas vezes ao dia em razão da redução da prata. No entanto, há dificuldades para atender a essa recomendação quando este composto é utilizado em curativos oclusivos, em função do trauma físico e emocional que cada curativo provoca no paciente e do alto custo dos recursos utilizados.

Dentre as diversas opções para tratamento de queimaduras têm sido também utilizadas pomadas contendo enzimas e ácidos graxos essenciais (AGE), como os ácidos linoléicos, caprílico, vitamina A, E e lecitina de soja. Os AGE possuem a capacidade de modificar reações inflamatórias e imunológicas, alterando funções leucocitárias e acelerando o processo de granulação tecidual. Os AGE podem ser utilizados diretamente sobre o leito da ferida ou

embebidos em gases estéreis, devendo ser trocados no máximo a cada 24 horas. Já as pomadas contendo enzimas como a colagenase, apresentam caráter desbridante, estimulando indiretamente a formação do tecido de granulação e, posteriormente, a reepitelização (Marinho, 1997). Outros agentes tópicos e soluções utilizados no tratamento de queimaduras incluem carvão ativado, ácido acético a 0,5%, hipoclorito de sódio a 0,5%, sulfametoxazol trimetoprima, peróxido de hidrogênio a 3%, antibióticos e antiinflamatórios diversos, dentre outros.

Quando requerido, de acordo com Williams (2002), o desbridamento cirúrgico deve ser realizado logo após o atendimento do paciente, uma vez que após 7 a 10 dias, o processo inflamatório encontra-se no ápice, com o fluxo sanguíneo em seu maior nível, sendo maior o risco de hemorragias em procedimentos cirúrgicos. Após essa etapa, é necessário o recobrimento da área danificada, que tem as funções de manter a umidade do local, a temperatura corpórea do paciente e diminuir as chances de contaminação do local afetado.

Nos últimos anos, vários materiais biologicamente ativos e substitutos de pele têm sido desenvolvidos. Embora um substituto ideal ainda não esteja disponível, esses produtos têm superado desafios no tratamento de feridas de pele. Uma das alternativas é a substituição do tecido lesado por pele autóloga transplantada, visto que o tecido ideal para o recobrimento dérmico é a pele do próprio paciente (Límová, 2010). Porém, esse método pode não ser o mais adequado em função da eventual falta de um ponto de coleta de pele ou mesmo devido às complicações e à morbidade a ele associado, visto que a retirada do tecido saudável pode causar a criação de outras feridas, equivalentes a uma queimadura de segundo grau (Atiyeh *et al.*, 2005).

Quando a pele de um doador não está disponível ou quando a condição do paciente não permite o recobrimento com o tecido autólogo, outra escolha como um curativo temporário é a pele obtida de cadáveres (Garfein *et al.*, 2003). Porém, o transplante de pele de outro doador é tão ou mais complexo do que transplantes de órgãos internos. Como a pele representa a interface do organismo com o ambiente externo, as células especializadas na resposta imunológica podem promover a rejeição do tecido heterólogo. Assim, a pele alógena constitui-se em um substrato de recobrimento temporário, sendo rejeitada após uma a duas semanas. Além disso, este método traz

riscos de infecção por vírus como os da hepatite ou a AIDS para o indivíduo receptor, além de não ter boa aceitação emocional por parte dos pacientes.

Nesse sentido, uma sinergia entre engenharia de materiais, nanotecnologia e engenharia de tecidos vem surgindo no desenvolvimento de biomateriais para aplicações em lesões como queimaduras.

2.3. Biomateriais

Biomateriais são dispositivos que, de modo contínuo ou intermitente entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo quando localizados fora do corpo (Lyman e Rowland, 1989). Tais materiais são projetados para reparar e/ou reconstituir partes ou funções do corpo humano, desempenhando funções em contato com tecidos vivos.

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que estes se destinam. Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser produzidos a partir de polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex.: biopolímeros), sendo manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos.

Os biomateriais não devem produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material não deve ser tóxico, carcinogênico, antigênico ou mutagênico. Em aplicações sangüíneas, eles devem também ser não-trombogênicos. As complicações oriundas dos dispositivos implantados variam de acordo com a sua aplicação. Por exemplo, infecções e biodegradação irão afetar mais fortemente dispositivos que têm aplicações de longa duração, como próteses permanentes e válvulas cardíacas.

A seleção do material a ser utilizado deve levar em consideração as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material, além de sua interação com o meio no qual este desempenha sua função. Algumas das principais propriedades que devem ser levadas em conta são: resistência mecânica, módulo de elasticidade, torsão ou flexão e bioestabilidade.

Uma importante aplicação dos biomateriais ocorre na área de curativos para o tratamento de lesões de pele de diferentes origens. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas nesse campo de atuação visando à obtenção de biomateriais com características que proporcionem qualidade na terapia e conforto ao paciente, além de custos competitivos.

2.3.1. Curativos

Devido às grandes mudanças ocorridas nas últimas décadas, as indústrias da área farmacêutica têm se empenhado em desenvolver produtos cada vez mais eficazes, específicos para cada tipo de ferida e que sejam economicamente viáveis.

Os produtos para tratamentos de feridas podem ser divididos em dois grandes grupos: agentes tópicos e curativos. Agentes tópicos são aqueles aplicados diretamente sobre o leito da ferida ou destinados à limpeza ou proteção da área em seu redor. Curativo, também chamado por alguns autores de cobertura, é o dispositivo que cobre uma ferida, com o objetivo de favorecer o processo de cicatrização e protegê-la contra agressões externas, mantendo-a úmida e preservando a integridade de sua região periférica. Normalmente os curativos são divididos em primários, quando usados em contato direto com o tecido lesado, e secundários, quando colocados sobre o curativo primário (Mandelbaum *et al.*, 2003)

Um curativo deve idealmente prover um micro-ambiente úmido que permita sua troca sem causar traumas. Deve ter características adequadas quanto à flexibilidade, transporte de gases e à remoção do excesso de exsudato, assegurando assim, um ambiente aeróbico e ao mesmo tempo promovendo uma barreira funcional contra infecções, viabilizando também o isolamento térmico da lesão.

Os curativos atualmente disponíveis no mercado podem ser classificados como convencionais, filmes de poliuretano, hidrocolóides, hidrogéis, curativos bioativos, curativos de alginato e enzimáticos (Blanes, 2004; Dallan 2005; Giovanazzi, 2009).

Os curativos convencionais são os mais empregados, sendo constituídos fundamentalmente de compressas de gaze. Podem ser utilizados também fazer a limpeza

mecânica diária da lesão, propiciando assim uma menor concentração bacteriana local e, conseqüente, a manutenção da cicatrização (Doughty, 1992).

Os filmes de poliuretano revestidos com adesivo acrílico são semipermeáveis, permitindo a troca de gases como O₂, CO₂ e vapor de água, sendo impermeáveis, entretanto, a líquidos e bactérias. Devido a sua transparência, permitem a inspeção contínua da ferida assim como a visualização da inserção de catéteres. A película de poliuretano recoberto possui propriedade elastomérica e distensível, sendo, portanto facilmente adaptável a áreas de contorno do corpo. O adesivo acrílico é hipoalergênico, permitindo aderência somente à pele íntegra e não aderindo à superfície úmida, evitando o trauma durante a sua retirada. São indicados para lesões com muita secreção. Entretanto, se não for retirado adequadamente, pode lesar a pele. Os filmes de poliuretano também não absorvem o exsudato proveniente da lesão e ainda não aderem muito bem na região sacral ou em peles oleosas, o que se constituem em limitações de seu uso (Blanes, 2004).

Os curativos do tipo hidrocolóides, ao serem colocados em contato com a ferida, interagem com o exsudato formando um gel que propicia o estabelecimento de um meio úmido na superfície da ferida, que estimula a síntese do colágeno e acelera o crescimento e a migração das células epiteliais. O gel evita a aderência à ferida e proporciona alívio da dor, por manter úmidas as terminações nervosas. A inibição do crescimento bacteriano é potencializada pelo microambiente ácido promovido pela oclusão com este tipo de curativo. Entretanto, esses tipos de curativos podem ocasionar a maceração do tecido ao redor da lesão, devido ao acúmulo de secreção durante o período entre as trocas, podendo levar ao aparecimento de um tecido de granulação exuberante (Stashak, 2004).

Os hidrogéis são géis transparentes, formados por redes tridimensionais de polímeros e copolímeros hidrofílicos contendo de 78 a 96% de água, além de uretanos, polivinil pirrolidona e polietileno glicol. Absorvem a secreção da região lesada, o que promove a redução da viscosidade do gel que, conseqüentemente, se torna líquido e libera água na superfície do ferimento (Lionelli, 2003).

Os curativos bioativos contêm substâncias que interferem diretamente nas fases da cicatrização, promovendo a aceleração da mesma. São indicados somente em situações especiais e têm o alto custo como sua maior limitação de uso.

Foram também desenvolvidos curativos antiodor (ex.: CarboFlex[®] da ConvaTec[®]), com o intuito de amenizar o mal cheiro que alguns ferimentos produzem. Estes são constituídos por duas camadas absorvíveis: uma interna de carvão ativado, com inclusão ou não de prata (como agente bactericida) e uma externa semipermeável (de nylon, curativo em filme ou espuma de polímeros). Secreções, bactérias e gases são absorvidos e neutralizados pelo curativo. Após o curativo estar completamente úmido, perde a sua função redutora de odor e deve ser trocado (Blanes, 2004).

Dentre os curativos enzimáticos (ex.: Kollagenase[®] da Cristália[®]), destacam-se os que contêm papaína (ex.: Panafil[®] da Healthpoint[®]), uma enzima proteolítica retirada do látex do mamão papaia (*Carica papaya*). Esta enzima, cujo sítio ativo é portador de um radical sulfidríla (SH), torna difícil sua associação com outro recurso terapêutico, visto que a mesma sofre oxidação pela substituição do enxofre por derivados de ferro, oxigênio e iodo. Sua ação fundamenta-se na lise de proteínas, resultando em desbridamento químico. Por ser uma enzima de fácil deterioração, os curativos que a contêm devem ser sempre mantidos em lugar fresco, seco, ventilado e protegido da luz. Tais curativos são utilizados no amolecimento e remoção de tecido desvitalizado, particularmente em pacientes nos quais esses tecidos são produzidos logo após o desbridamento cirúrgico (Lionelli, 2003).

De acordo com Yudanov e Reshetov (2006), novos curativos têm sido desenvolvidos com características diferenciadas dos tradicionais tanto em concepção como em propriedades. Polímeros naturais, principalmente polissacarídeos e proteínas, vêm sendo muito utilizados no desenvolvimento destes novos curativos, pois apresentam alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e frequentemente, atividade fisiológica. Como exemplo de compostos pertencentes a esse grupo de biopolímeros pode-se citar a celulose e seus derivados (metilcelulose, carboximetilcelulose), o hialuronato, a carragena, a pectina, a xantana, a

fucoidina, a zosterina, a goma arábica, o tragacanto (exsudato gomoso extraído de plantas do gênero *Astragalus*), o polilactato, a quitosana e o alginato.

2.4. Biopolímeros

Os biopolímeros são materiais poliméricos cuja matéria-prima principal para sua manufatura é uma fonte de carbono renovável. O aumento da demanda destes compostos por parte do mercado cresceu principalmente devido ao aumento da sensibilização para a poluição ambiental. Segundo a Global Markets Direct (2009), o mercado dos biopolímeros deverá crescer em 27,18% no período de 2008 a 2015.

Esses materiais apresentam uma grande diversidade de aplicações no campo da engenharia de tecidos, na medicina regenerativa e em dispositivos médicos. Exemplos de sistemas constituídos de biopolímeros são: implantes ortopédicos, válvulas cardíacas, marcapassos, bioeletrodos, biossensores, lentes de contato, sistemas de liberação controlada de medicamentos e curativos para pele, dentre outros.

As três grandes classes de biopolímeros são: polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Os polissacarídeos, em particular, possuem diversos papéis em organismos vivos e na natureza como um todo, sendo elementos-chave em processos biológicos. Esses materiais possuem muitas características vantajosas como sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade biológica. Os polissacarídeos são muito importantes devido a sua solubilidade e propriedades tecnológicas, como gelificação, emulsificação e propriedades de hidratação, dentre outras.

São geralmente obtidos por biossíntese em plantas, animais e bactérias como, por exemplo, o ácido hialurônico, a gelana e a xantana, respectivamente. Muitos desses polissacarídeos são considerados ótimos candidatos para aplicações biomédicas, destacando-se o alginato e a quitosana (Rinaudo, 2008), com uso já estabelecido em variadas aplicações.

2.4.1. Quitosana

A quitina é um co-polímero composto por unidades N-acetil-glucosamina e N-glucosamina distribuídas aleatoriamente e por meio de sua desacetilação é obtida a quitosana. A estrutura primária da quitosana é praticamente idêntica à da quitina e o que a diferencia é a predominância de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose na quitosana. A estrutura química da quitosana é indicada na Figura 2.1. Vale ressaltar que os resíduos de D-glucosamina e N-acetilglucosamina são encontrados também em tecidos de mamíferos (Khan *et al.*, 2000), fato que reforça ainda mais seu caráter de alta biocompatibilidade.

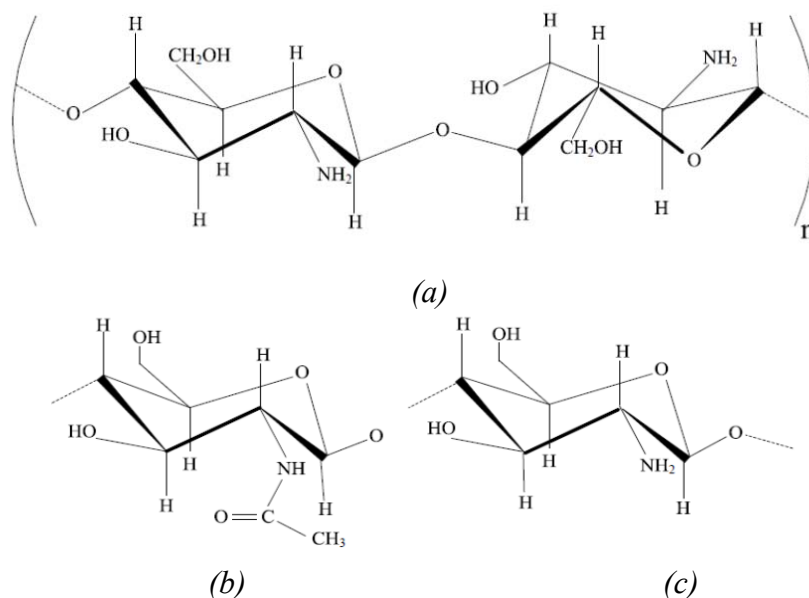


Figura 2.1 – Estrutura química da quitosana (a) e suas unidades N-acetil glicosamina (b) e D-glicosamina (c).

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases bem como sua baixa produtividade. Além disso, apenas quitinas pouco cristalinas e de baixa massa molar são susceptíveis à hidrólise enzimática. A fusão alcalina promove acentuada desacetilação, mas é acompanhada de severa despolimerização, o que limita fortemente sua aplicação. A desacetilação homogênea também tem sua aplicação limitada,

principalmente devido à baixa eficiência e aos prolongados tempo de reação. A desacetilação heterogênea é a mais utilizada para a obtenção de quitosanas de grau intermediário de acetilação. Nesse tipo de desacetilação são empregadas soluções aquosas alcalinas, altas temperaturas e intervalos prolongados (Izume *et al.*, 1992) e a reação ocorre preferencialmente na região amorfa do polímero, deixando a região cristalina intacta (Aranaz *et al.*, 2009).

A completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que favorecem a sua progressiva despolimerização (Dallan, 2005). Geralmente, o grau de desacetilação da quitosana comercial varia de 70 a 95%, e sua massa molar encontra-se na faixa de 10^4 a 10^6 g.mol⁻¹ (Malafaya *et al.*, 2007).

O grau médio de acetilação define a porcentagem de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose presentes nas cadeias do polímero. Não há limites bem definidos em termos dos conteúdos de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose para a distinção de quitina e quitosana. Em geral, o termo quitosana refere-se às moléculas que contêm ao menos 50% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose.

Em função de suas composições distintas, os polímeros quitina e quitosana, exibem propriedades bem diferentes. Ao contrário da quitina, a presença de grupos amino livres ao longo da cadeia de quitosana permite que esta macromolécula seja solúvel em soluções aquosas diluídas de vários ácidos devido à protonação dos grupos amino ($-NH_3^+$) e à consequente repulsão inter e intramolecular das cadeias poliméricas (Aranaz *et al.*, 2009). As soluções de ácido acético e clorídrico são as mais comumente empregadas para este fim (Shamov *et al.*, 2002).

A carga elétrica líquida da quitosana em meio ácido é um importante parâmetro. Esse composto se comporta como um polieletrólito, apresentando alta densidade de cargas positivas (uma por unidade de glicosamina). Uma vez que biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, dentre outras, podem apresentar grupamentos de cargas negativas em suas moléculas, freqüentemente verifica-se apreciável interação destas com a quitosana, o que explica sua atividade sobre as mesmas.

A quitosana é um excelente floculante devido à presença do grande número de grupos amino em sua estrutura, os quais podem interagir com colóides carregados negativamente. Como exemplo, tem-se a facilidade de aderência da quitosana em polímeros naturais como o cabelo e a pele, constituídos por proteínas e mucopolissacarídeos com cargas negativas. Outra importante propriedade da quitosana refere-se à sua capacidade de complexação com diversos íons metálicos, sendo, deste modo, útil na quelação do ferro, cobre e magnésio. Tal fato possibilita sua utilização em processos de remoção de íons de metais pesados tóxicos, tais como prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo que se encontrem em níveis acima dos limites de tolerância e/ou permitidos (Dallan, 2005).

Comercialmente, a quitina e a quitosana são obtidas de carapaças de crustáceos, como caranguejos e camarões (Khor e Lim, 2003), sendo sintetizadas em um total de aproximadamente 1 bilhão de toneladas por ano e biodegradadas sem acúmulo excessivo na natureza. A estimativa mundial para a produção industrial de quitina a partir de carapaças de crustáceos é de 50.000 toneladas por ano. Somente a produção de crustáceos nos Estados Unidos (150.000 t de camarões, 25.000 t de lagostas e 85.000 t de caranguejos) é capaz de fornecer matéria-prima para a produção anual de aproximadamente 15.000 toneladas de quitina (Pradella, 2006).

Comercialmente, a quitina e a quitosana são produzidas, principalmente, na Índia, no Japão, na Polônia, na Noruega, na Austrália e na China, sendo que o valor de mercado da quitosana depende diretamente de fatores relacionados às suas características físico-químicas, bem como da sua aplicação final (Pradella, 2006).

A quitosana exibe diversas propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, e tem várias aplicações em diferentes campos, conforme já mencionado, como por exemplo, no tratamento de água não potável, na agricultura, na formulação de cosméticos, no processamento de alimentos e em aplicações biomédicas (Almeida, 2009), o que vem despertando interesse na comunidade científica mundial. No entanto, o reconhecimento de seu valor científico não apareceu logo após sua descoberta e sim após o conhecimento de suas propriedades (Kurita, 2006).

No campo de aplicações biomédicas, é amplamente estudada, e suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento têm levado ao aumento de sua utilização na área de engenharia de tecidos, como no reparo da pele, ossos e cartilagens. Testes clínicos mostram que biomateriais baseados em quitosana não resultam em reações alérgicas no corpo humano após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão (Khor e Lim, 2003).

A quitosana é facilmente hidrolisada por várias quitosanases, as quais são completamente ausentes em mamíferos, porém, dependendo do grau de acetilação, a quitosana pode ser hidrolisada pela lisozima, o que possibilita sua degradação no organismo humano e permite seu uso como biomaterial biorreabsorvível. A lisozima tende a degradar as ligações entre os grupos N-acetil D-glucosamina muito mais rápido do que degrada os grupos D-glucosamina, e a degradação da quitosana leva à liberação de amino-açúcares que podem ser incorporados nas rotas metabólicas de glicosaminoglicanas e glicoproteínas, ou simplesmente excretados pelo organismo (Aiba, 1992). Os oligômeros de N-acetil-D-glucosamina, os produtos da degradação enzimática da quitosana, apresentam propriedades cicatrizantes e antimicrobianas (Almeida, 2009).

Além de ser um polímero bioativo, a quitosana é um agente homeostático, que apresenta propriedades anti-trombogênicas. Também possui a capacidade de estimular o sistema imune do organismo contra infecções virais e bacterianas. Finalmente, favorece a regeneração de tecidos moles (como a pele) e duros (como por exemplo, os ossos) (Muzzarelli, 1993; Muzzarelli *et al.*, 1994).

Foi observado que os oligossacarídeos da quitosana têm efeito estimulatório nos macrófagos e, tanto a quitina como a quitosana são quimiotáticos para neutrófilos, estimulando a formação de tecido de granulação e acelerando a reepitelização. Para a utilização da quitosana na cura de feridas, sua interação com as células presentes na pele é fundamental. Experimentos realizados por Chatelet *et al.* (2001) demonstraram que a proliferação dos queratinócitos sobre membranas de quitosana está relacionada com o grau de acetilação das mesmas, sendo que uma menor acetilação favorece o crescimento dos queratinócitos. No mesmo ano, Howling *et al.*

(2001) demonstraram que o crescimento de fibroblastos é favorecido quando o meio de cultura (DMEM) possui quitosana dissolvida (5-500 /mL), com grau de acetilação por volta de 15%.

A quitosana pode ter ainda seu uso ampliado quando combinada com outros materiais, por exemplo: heparina (He *et al.*, 2007), xantana (Veiga, 2009) e alginato (Rodrigues, 2008; Bueno, 2009; Meng *et al.*, 2010), dentre outros.

2.4.2. Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons (*Macrocystis pyrifera*). Desde que foi descoberto por Stanford em 1881, tem sido utilizado em vários tipos de indústrias, como alimentícias, têxteis e farmacêuticas (Qin, 2008).

Para a extração do alginato, as algas marinhas são moídas e agitadas em uma solução de pH básico aquecida, usualmente de carbonato de sódio. O processo de extração consiste em converter os sais insolúveis em água (alginato de cálcio e magnésio) em alginato de sódio, que é solúvel em água. O alginato de sódio é então diluído e os resíduos das algas são removidos por filtração. O biopolímero pode então ser recuperado da solução por meio da adição de um sal de cálcio. Isso faz com que haja formação de alginato de cálcio insolúvel. Após sua recuperação, um ácido é então adicionado para convertê-lo a ácido algínico, o qual é separado facilmente da mistura. O ácido algínico passa então por um processo de filtração para retirada de parte do líquido presente. Adiciona-se então carbonato de sódio até convertê-lo a alginato de sódio. A pasta de alginato de sódio resultante pode ser extrudada em *pellets* que são então secos e moídos (McHugh, 2003).

O alginato é composto por duas diferentes unidades repetitivas, (1,4)- α -L-guluronato (unidade G) e (1,4)- β -D-manuronato (unidade M), em variadas proporções e arranjos sequenciais (Sæther *et al.*, 2008), conforme indicado na Figura 2.2.

O alginato na presença de cátions multivalentes, tem a capacidade de formar géis. As propriedades gelificantes deste composto resultam da ligação cooperativa de cátions divalentes com os blocos homopoliméricos dos resíduos do guluronato, os blocos G. Dentre os cátions

divalentes mais frequentemente utilizados, destacam-se o magnésio, o cálcio, o estrôncio e o bário, sendo mais comumente empregado o cálcio. Os íons Ca^{2+} localizam-se nas cavidades eletronegativas, e as interações iônicas entre os blocos de guluronato e os cátions causam a formação de um gel termoestável resistente.

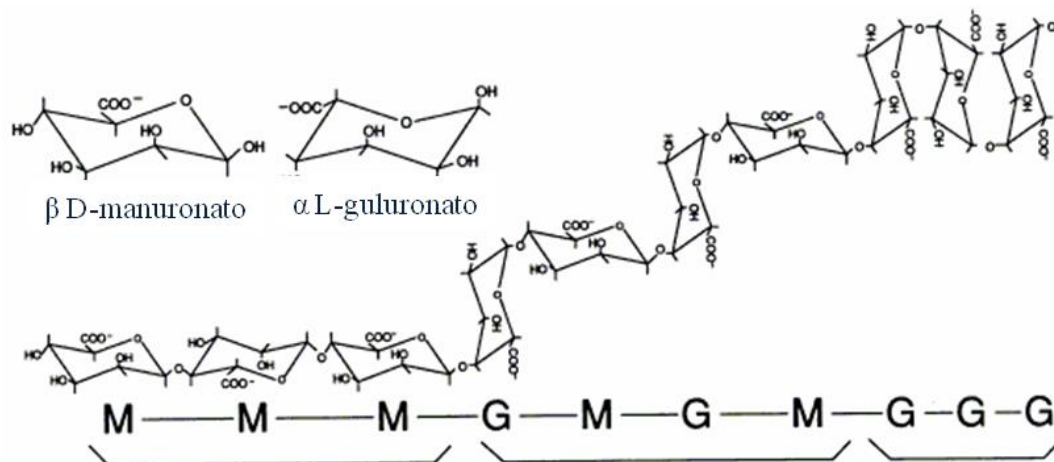


Figura 2.2 - Estrutura química do alginato, na qual as letras M representam os resíduos de manuronato e G, os resíduos de guluronato (adaptado de Rodrigues, 2008).

De acordo com Dealey (1994), nos últimos 50 anos o alginato tem sido muito utilizado em curativos como géis, espumas e no recobrimento de feridas. A capacidade de gelificação dos alginatos auxilia na remoção das coberturas preparadas a partir deste composto, uma vez que estas não aderem no leito da lesão, o que diminui a dor e o trauma associados às trocas de curativo. A utilização de curativos contendo alginato em pacientes queimados pode promover redução da dor pelo bloqueio dos terminais nervosos, e acelerar o processo de cicatrização dos sítios doadores de pele para enxerto (Paul e Sharma, 2004).

Quando em solução e em determinadas condições de pH, o alginato possui resíduos carboxílicos ($-\text{COO}^-$) livres, ou seja, carga líquida negativa, sendo capaz de interagir ionicamente com outros polímeros com carga líquida positiva, como por exemplo a quitosana, e formar um complexo de polieletrólitos (PEC) com propriedades adequadas visando a produção de curativos e de outros dispositivos biocompatíveis e biodegradáveis, conforme discutido a seguir.

2.4.3. Complexos de polieletrólitos de quitosana e alginato

Os polieletrólitos são macromoléculas que possuem um considerável número de grupos funcionais que podem se tornar carregados em condições apropriadas de pH. As moléculas podem constituir-se de policátions ou poliânions, sendo sua carga elétrica dependente da natureza dos seus grupos funcionais (Simsek-Ege *et al.*, 2003).

Diferentes características em um PEC podem ser obtidas conforme variam as propriedades químicas dos polímeros, como massa molar, flexibilidade, densidade de cargas, hidrofilicidade e hidrofobicidade e também variando as condições de reação entre os polímeros, como pH, força iônica, concentração, taxa de reação e temperatura (Rodrigues, 2008; Sankalia *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002).

Conforme já mencionado, a quitosana e o alginato são polieletrólitos de cargas líquidas opostas, positivas e negativas, respectivamente. Os grupos carboxílicos do alginato podem interagir ionicamente com os grupos amino protonados da quitosana, formando um PEC. Comparado com os polímeros isoladamente utilizados, o PEC formado de quitosana-alginato é flexível, possui uma menor tendência de intumescimento, melhora a estrutura e a resistência à dissolução a baixos valores de pH (Li *et al.*, 2008).

O pH afeta drasticamente o comportamento do complexo de quitosana-alginato, como mostrado na Figura 2.3. Em condições de elevado pH, a interação entre o alginato e a quitosana é comprometida, assim como em baixo pH. Isso ocorre porque há preponderância de ionização do alginato e da quitosana isolados, respectivamente, nestas condições. Para promover a formação de um PEC estável, Cárdenas *et al.* (2003) propõem o ajuste do pH para 5,28, valor intermediário aos valores de pK_a da quitosana ($pK_a = 6,5$) e do alginato (pK_a entre 3,4 a 4,4) (Yan *et al.*, 2000), garantindo que a quitosana esteja potencialmente protonada e o alginato, desprotonado.

Os complexos polieletrólitos podem ser reforçados, em relação à resistência mecânica, através da adição de íons, induzindo a formação de sistemas ligados ionicamente, como por exemplo, pelo íon Ca^{++} , que pode ser adicionado em complexos contendo alginato ou pectina (Berger *et al.*, 2004).

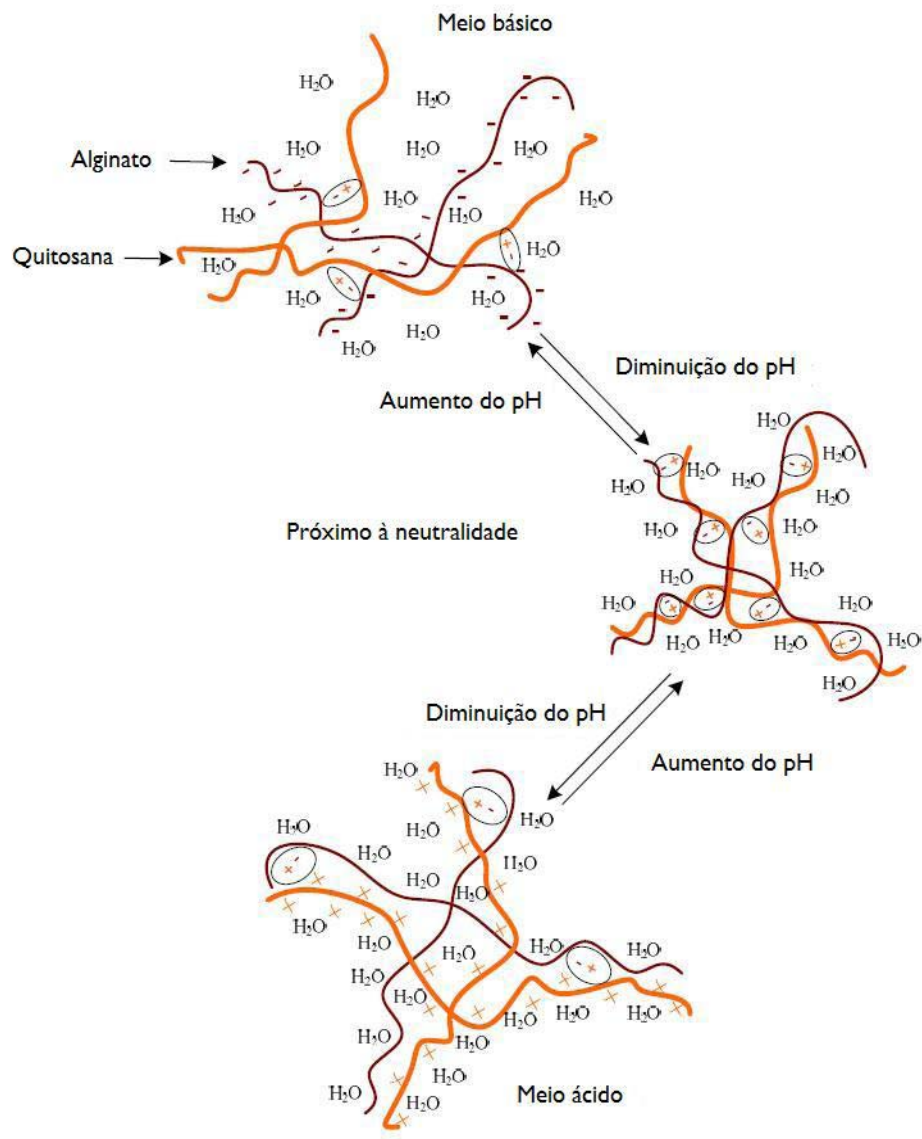


Figura 2.3 - Efeito do pH no complexo de polieletrólitos formado por quitosana e alginato. Os círculos representam as interações iônicas entre as cargas negativas do alginato e as cargas positivas da quitosana (adaptado de Rodrigues, 2008).

Os complexos de quitosana e alginato podem ser obtidos por meio da produção controlada de coacervados das matérias-primas e em sua moldagem e secagem após reticulação iônica em solução aquosa de cloreto de cálcio. Yan *et al.*(2000) sugerem que a mistura deve ser feita sob

condições controladas de temperatura e agitação da mistura. Sugerem também que a taxa de adição da solução de quitosana na de alginato seja lenta para prevenir a formação de membranas interfásicas, possibilitando que a reação entre os polímeros seja completa.

Diante disso, Rodrigues (2008) avaliou diversos parâmetros na formação de complexos polieletrólitos de quitosana e alginato, tais como: a concentração das soluções poliméricas (a de alginato variou de 0,25 a 0,5% m/v e de quitosana de 0,5 a 1,0% m/v), a taxa de agitação (de 100 a 500 rpm), a taxa de adição da solução de quitosana (de 20 a 40 mL/h) à de alginato e o volume de CaCl_2 (de 0,5 a 1,0 mL) para a reticulação primária. A mistura foi realizada em um reator de vidro encamisado seguida de uma etapa de desaeração e secagem.

Nesse sentido, visando o aumento de escala e melhoria das propriedades mecânicas da membrana, Bueno (2010) propôs modificações para o trabalho de Rodrigues (2008). A taxa de agitação variou de 500 a 1000 rpm, a taxa de adição da solução de quitosana de 120 a 160 mL/h e 3,6 mL de CaCl_2 foram utilizados para a reticulação iônica. Bueno (2010) estudou também o efeito da adição de surfatantes (Tween 80, Span 80 e Pluronic F68) e de outros reticulantes, como glutaraldeído e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ao complexo polieletrólito, a fim de obter membranas mais resistentes e com melhores propriedades para serem utilizadas em curativos.

Dessa forma, além do uso como agente espessante na indústria de alimentos, em aplicações em cultivo celular, como trocador de íons para remover metais pesados provenientes de resíduos industriais e em sistemas de liberação de produtos farmacêuticos, dispositivos isolados e em conjunto de quitosana e alginato podem ser utilizados no tratamento de feridas (Paul e Sharma, 2004; Li *et al.*, 2008).

De acordo com Paul e Sharma (2004), o complexo de quitosana e alginato pode ser empregado para a produção de membranas flexíveis, finas, transparentes e mais eficientes nos tratamentos de lesões do que os curativos convencionais. Assim, a incorporação de fármacos, como compostos contendo prata, em membranas de quitosana e alginato consiste em uma estratégia relevante para aplicações de membranas obtidas pelo uso destes polissacarídeos como curativos em feridas infectadas.

2.5. *Uso da prata como agente antimicrobiano em lesões dérmicas*

O objetivo em um tratamento de lesões de pele é a cura total e a re-epitelização rápida a fim de prevenir a ocorrência de infecções. Uma das estratégias mais comumente empregadas para combater a ameaça de infecção bacteriana é o uso de metais nobres com atividade antimicrobiana como, por exemplo, a prata. Há muitos anos, a prata é conhecida pelas suas propriedades antimicrobianas. Em 1000 D.C, as propriedades antimicrobianas da prata eram utilizadas para se obter água potável. Há séculos, os compostos de prata também têm sido explorados na área médica. No século XIX eram utilizados como remédios populares para o tratamento de tétano e reumatismo e antes mesmo do advento dos antibióticos no século XX, tais compostos já eram usados no tratamento de resfriados e de gonorréia. A prata tem sido aplicada há muitos anos no tratamento de infecções encontradas em queimaduras, feridas abertas e úlceras crônicas (Atiyeh *et al.*, 2007).

A prata é descrita como oligodinâmica, por apresentar atividade microbida em baixas concentrações. Dibrov *et al.* (2002) apontam que baixas concentrações de prata induzem uma dispersão protônica através da membrana bacteriana, resultando na morte celular. Percival *et al.* (2005) sugerem que a ligação na superfície e o dano nas funções principais da membrana celular são os principais mecanismos de ação da prata como microbida. Na presença de exsudatos ou outras secreções, a prata se ioniza e torna-se reativa, ligando-se a moléculas negativamente carregadas, como alguns componentes das membranas celulares. Além disso, a prata causa o envenenamento de enzimas e de componentes do sistema de transporte de elétrons (Hermans, 2007). A ação inibitória da prata pode ser atribuída a sua forte interação com grupos tiol, presentes nas enzimas respiratórias das bactérias. Sua interação com grupos sulfidril livres pode, também, levar à inativação da enzima fosfomanose isomerase (Kirsner *et al.*, 2001; Atiyeh *et al.*, 2007). A prata ainda pode interagir com as proteínas estruturais e preferencialmente, se ligar com as bases do DNA, inibindo a replicação do mesmo.

Além disso, diversos estudos clínicos e experimentais alegam que os curativos de prata promovem a cicatrização de feridas por meio da promoção de hemostasia, reduzindo a inflamação e melhorando a re-epitelização e a vascularização. Com relação à hemostasia, estudos

apontam o aumento da concentração de cálcio local. Com relação à inflamação, a prata tem a habilidade de inibir a formação de matrizes de metaloproteinases. Estas proteínas tendem a aumentar em muitas feridas crônicas e podem impedir a cicatrização, pois degradam o colágeno (Qin *et al.*, 2006; Hayes e Toner, 2007).

Para que a prata esteja biologicamente ativa, ela deve estar na sua forma solúvel como Ag^+ ou aglomerados de Ag^0 . A eficiência de um curativo que contém prata é determinada pela quantidade total solubilizável de prata e não pela quantidade contida no curativo (Dunn e Edward-Jones, 2004). Os íons prata são muito eficazes contra uma grande variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e enterococos resistentes a vancomicina (VRE) (Wright *et al.*, 1998; Leaper, 2006).

A liberação da prata nos curativos quando em contato com os exsudatos das lesões pode ocorrer por meio de três mecanismos: pela troca dos íons prata com os íons sódio e cálcio encontrados no exsudato, pela quelação dos íons prata com moléculas de proteínas presentes no exsudato, e pela migração das partículas de prata, que podem se destacar da matriz do curativo e serem transportadas para o exsudato (Qin, 2005).

Muitos produtos têm incorporado agentes antibacterianos contendo prata, como o nitrato de prata e a sulfadiazina de prata. Curativos como o ActicoatTM e o Silverlon[®] liberam de forma controlada partículas nanocristalinas de prata em determinados tipos de feridas. Esse tipo de liberação permite que o curativo seja trocado com menos frequência, reduzindo o risco de contaminação durante as trocas, além de diminuir o desconforto do paciente. O Actisorb Silver 220 (da Johnson & Johnson) é um curativo de carvão ativado ao qual a prata está ligada. O funcionamento do Actisorb consiste em adsorver as bactérias na matriz de carvão, onde são mortas pela prata (Müller *et al.*, 2003).

Embora a disponibilidade de curativos comerciais contendo prata seja alta, existem dúvidas sobre o mecanismo de atuação dos mesmos, por exemplo, em relação à taxa de liberação da prata do curativo, se as eventuais reações inflamatórias observadas e que prejudicam a cicatrização da ferida são originadas dos compostos à base de prata ou da matriz que os incorpora, ou então sobre o nível de penetração do agente antimicrobiano na ferida. Como

exemplos suplementares de curativos contendo prata, pode-se citar curativos como o Aquacel-Ag (Convatec, Skillman) e as fibras de nylon com prata impregnada em carvão (Canada *et al.*, 2003) que necessitam que haja uma hidratação para que o íon prata seja deslocado da matriz, levando a uma liberação mais lenta do agente antimicrobiano (Mishra *et al.*, 2007). Por outro lado, têm-se os curativos revestidos com prata que resultam em baixa concentração do íon no leito da lesão (Atiyeh *et al.*, 2007). Já os sais de prata hidrossolúveis se solubilizam muito rapidamente em contato com o exsudato (Freeman *et al.*, 2007), liberando a prata logo no início do tratamento, o que faz com que trocas freqüentes do curativo sejam necessárias. Da mesma forma, têm-se as partículas nanocristalinas de prata que normalmente lançam inicialmente uma grande quantidade de prata no leito da lesão, muitas vezes sob a forma de flocos, que podem levar à irritação da ferida.

Uma das maiores aplicações da prata é a combinação com a sulfadiazina para uso como um agente antimicrobiano no tratamento de queimaduras (Hollinger, 1996). A sulfadiazina de prata é um composto de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivo contra uma ampla microbiota de gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* sp e *Pseudomonas aeruginosa*, além de apresentar também atividade contra bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. É facilmente aplicada e removida e não provoca dor. É absorvida pela pele, onde forma reservatórios de íons prata e é liberada nos tecidos adjacentes. Como consequência disso, causa diminuição de glóbulos brancos do sangue (leucopenia), descoloração da pele devido à deposição da prata (*argyria*), peroxidação lipídica no fígado e rins, perda de identificação celular, redução da capacidade de proliferação e alterações degenerativas nas organelas citoplasmáticas e do núcleo (Lansdown, 2002; Ferreira *et al.*, 2003). Yu *et al.* (2005) produziram esponjas de quitosana e alginato incorporadas com sulfadiazina de prata a partir de uma solução de quitosana e alginato que foi liofilizada e reticulada com sulfato de cálcio. A presença de macroporos torna esse material permeável a microrganismos de forma que o mesmo poderia não proteger eficientemente a lesão de nova contaminação caso o efeito do fármaco cesse ao longo do tratamento.

Diante disso, novas tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativa aos dispositivos que contém compostos antimicrobianos que causam reações citotóxicas (Lansdown, 2002). Nesta

categoria podem ser citados os curativos MaxSorb[®] Extra Ag (Medline Industries, Inc), Select Silver (Milliken & Medical), a espuma de poliuretano Comfeel (Coloplast Co.) e as fibras de alginato com prata Invacare (Invacare Co.). Estes materiais, no entanto, são formulados na forma de fibras, muitas vezes requerendo o uso de curativos secundários (como é o caso das fibras compactadas dos absorventes MaxSorb[®] Extra Ag e Invacare) para possibilitar sua fixação na região lesada. Todos contêm em suas composições o AlphaSan[®], um composto de prata inorgânico e insolúvel em água, que não apresenta efeitos colaterais como a sulfadiazina de prata.

2.5.1. AlphaSan[®] RC2000

O AlphaSan[®] é uma família de compostos contendo prata. Comercialmente, é encontrado como AlphaSan[®] RC5000, AlphaSan[®] RC7000 e AlphaSan[®] RC2000.

O AlphaSan[®] RC5000 contém aproximadamente 3,8% de prata, e sua fórmula molecular é $\text{Ag}_{0,18}\text{Na}_{0,57}\text{H}_{0,25}\text{Zr}_2(\text{PO}_4)_3$. O AlphaSan[®] RC7000 constitui-se de uma blenda de 31% de AlphaSan[®] RC2000 e 69% de óxido de zinco. O AlphaSan[®] RC2000 é um aditivo antimicrobiano com 99% de pureza, cuja fórmula molecular é $\text{Ag}_{0,46}\text{Na}_{0,29}\text{H}_{0,25}\text{Zr}_2(\text{PO}_4)_3$. Assemelha-se a cristais em forma de cubo, com um tamanho médio de partícula de cerca de um micrômetro. Na Figura 2.4 está apresentada a estrutura do AlphaSan[®] RC2000, que consiste em uma forma romboédrica de fosfato hidrogenado de zircônio de sódio $\text{NaZr}_2(\text{PO}_4)_3$ com muitas cavidades equidistantes contendo prata (Milliken Chemical, 2002). A porcentagem de prata neste material é de 10% em peso.

O AlphaSan[®] RC2000 é um composto em pó, de coloração esbranquiçada, inodoro, não explosivo, estável à temperatura ambiente e praticamente insolúvel em água ($2,6 \times 10^{-4}$ g/L à 20 °C) (AlphaSan[®] RC2000: Material Safety Data Sheet, 2002). Em testes com ratos de linhagem *Sprague-Dawley CD*, foi observada baixa toxicidade do composto por via oral e nasal e nenhuma toxicidade quando em contato com a pele (NICNAS, 2004).

A prata é liberada desse composto por meio da troca iônica com os íons sódio. Em contato com o sódio presente no exsudato de feridas, o AlphaSan[®] libera de forma contínua os íons prata, provendo proteção contra um amplo espectro de bactérias e fungos.

O AlphaSan[®] pode permanecer em suspensão em misturas viscosas, não sendo observada incompatibilidade deste com outros materiais (Milliken Chemical, 2002), o que possibilita que o mesmo possa ser adicionado aos complexos poliméricos formados entre a quitosana e o alginato.

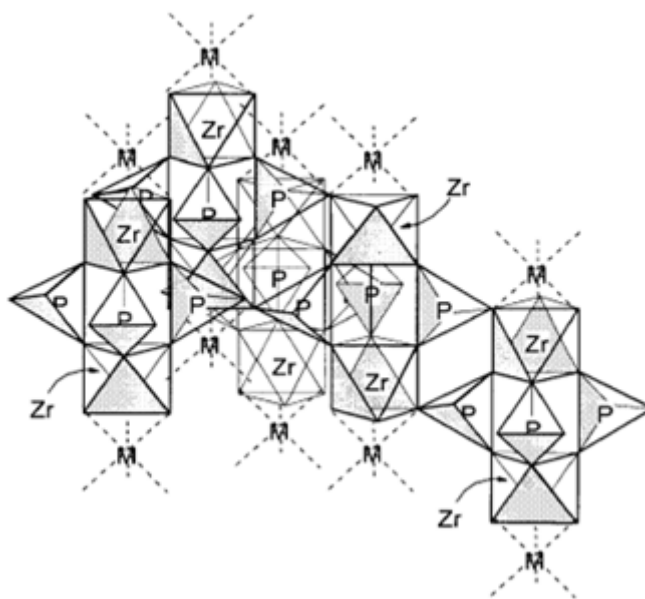


Figura 2.4 – Estrutura tridimensional do AlphaSan[®]. M representa os íons metálicos sódio, prata e hidrogênio.

Dessa forma, de acordo com as propriedades já mencionadas de membranas de alginato e quitosana como curativos, uma alternativa visando uma melhoria de suas características seria incorporar o AlphaSan[®], a fim de se obter produtos com atividade antimicrobiana e que simultaneamente atuem no sentido de melhorar a cicatrização em função dos componentes polissacarídicos.

Nesse sentido, foi escolhido o AlphaSan[®] RC2000 dentre os diversos compostos desta categoria por este apresentar uma concentração mais elevada de prata, necessitando uma menor quantidade do composto a ser incorporado nas membranas.

2.6. Incorporação de fármacos em matrizes poliméricas

A incorporação de agentes bioativos em dispositivos de uso clínico tem possibilitado a obtenção de novos produtos tecnológicos para aplicação nas áreas médicas e farmacêuticas. Um exemplo é a incorporação de agentes ativos em implantes temporários ou permanentes, na tentativa de reduzir infecções e melhorar a aceitação orgânica do material implantado, minimizando a possibilidade de rejeição. Como exemplo, tem-se o Septopal® (Merck S.A.) que é um dispositivo comercialmente disponível para ser introduzido cirurgicamente em ossos e partes moles, para tratamento e profilaxia de infecções causadas por microrganismos sensíveis à gentamicina. É apresentado na forma de cordões compostos por esferas de copolímero de metacrilato de metila e acrilato de metila unidas por fio cirúrgico. As esferas contêm o agente antibiótico sulfato de gentamicina. O tempo suficiente para que Septopal® atue no processo infeccioso é de 10 a 14 dias. Após esse período realiza-se sua retirada pela esfera exteriorizada. Outro exemplo são os *stents*, utilizados para dilatar a artéria coronária, que podem ser recobertos com fármacos antiproliferativos que, ao serem liberados localmente, reduzem a possibilidade de reoclusão e aceleram a revascularização local (Villanova *et al.*, 2010).

Com frequência, produtos bioativos são incorporados em matrizes poliméricas. Numerosos sistemas de liberação de drogas estão já descritos na literatura, nos quais o princípio ativo a ser incorporado pode estar ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (Wang *et al.*, 2000).

Os fármacos podem ser incorporados às matrizes poliméricas em várias etapas do processo de produção. A matriz pode ser preparada com antecedência e, em seguida, colocada em contato com uma solução altamente concentrada de fármaco capaz de intumescê-la (técnica de absorção do solvente contendo o agente ativo). Em seguida, o solvente é removido, por meio de tratamento físico (Grassi e Grassi, 2005). Os fármacos podem ser ainda incorporados nas matrizes utilizando fluidos supercríticos (Duarte *et al.*, 2007). Outra maneira é comprimir, em uma proporção adequada, o polímero, a droga e os excipientes, para obter uma matriz na qual o fármaco fica disperso. Alternativamente, o fármaco, em forma de um pó fino, pode ser misturado

com o polímero formador da matriz e, posteriormente, o polímero é reticulado ficando, neste caso, o fármaco retido na estrutura da matriz.

Nesse contexto, há uma ampla variedade de matrizes poliméricas que podem incorporar diversos tipos de fármacos com aplicações distintos, entre elas: antidepressivos, analgésicos, antipiréticos, antialérgicos, expectorantes, antiasmáticos, anestésicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos, como é apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Exemplos de matrizes poliméricas utilizadas na liberação controlada de fármacos.

Composição da matriz	Fármaco	Aplicação	Referência
Quitosana e alginato (PEC)	Sulfadiazina de Prata	Antimicrobiano	Meng <i>et al.</i> (2010)
Quitosana e alginato	Bacitracina	Antimicrobiano	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
Quitosana e alginato	Diclofenaco de Sódio	Antiinflamatório	González-Rodríguez <i>et al.</i> (2001)
Pectina e quitosana (PEC)	Paracetamol	Analgésico e antipirético	Fernández-Hervás e Fell (1998)

Vários autores relatam a incorporação de agentes ativos diversos em matrizes de quitosana e alginato isolados ou em conjunto. Wang *et al.* (2007) incorporaram hidrocloreto de ciprofloxacina em filmes de quitosana e polietilenoglicol durante o processo de mistura dos polímeros. Da mesma forma, Meng *et al.* (2010) incorporaram a sulfadiazina de prata durante o processo de complexação da quitosana com o alginato. Já Tavakol *et al.* (2009) adicionaram sulfasalazina previamente em uma das soluções poliméricas. Por outro lado, Rodrigues (2008) incorporou bacitracina em membranas de quitosana e alginato após a complexação da quitosana ao alginato.

As propriedades físicas e químicas dos polímeros e dos fármacos em si exercem um importante papel na cinética de liberação de drogas incorporadas em membranas, sendo que o meio utilizado para a dissolução do fármaco pode ter efeito decisivo no comportamento global do sistema (Wang *et al.*, 2000). Com frequência, resultados distintos são observados ao se comparar a cinética de liberação de fármacos de matrizes poliméricas em água e em soluções salinas tamponadas.

2.7. Liberação de fármacos incorporados em matrizes poliméricas

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da tecnologia associada à modificação e controle da liberação de fármacos ou de outras substâncias com atividade biológica aumentou significativamente. Um dos principais objetos de investigação na indústria farmacêutica tem sido ampliar a variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos. Entre esses sistemas estão as bombas osmóticas (Malaterre *et al.*, 2009), os lipossomas (Mourtas *et al.*, 2007) e os sistemas matriciais poliméricos (Grassi e Grassi, 2005).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada depende da seleção de um agente adequado capaz de controlar a liberação do fármaco, manter a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou liberar o fármaco em um determinado tecido ou órgão desejado (Raval *et al.*, 2010). Dentro das várias opções, os polímeros são agentes eficientes para atuar nesta função. A utilização dos sistemas matriciais poliméricos é uma das estratégias mais utilizadas na liberação controlada devido à sua versatilidade, eficácia e baixo custo. Além disso, os sistemas matriciais permitem a incorporação de quantidades relativamente altas de fármacos. De forma geral, um sistema matricial pode ser definido como um dispositivo que controla a liberação da substância ativa molecularmente dispersa ou dissolvida em um suporte resistente à desintegração (Lopes *et al.*, 2005).

A liberação de substâncias ativas pode ser resultante de vários fatores tais como: a erosão e o intumescimento das matrizes, a taxa de penetração da água na matriz, a difusão e distribuição

do fármaco na matriz, a proporção entre o fármaco e a quantidade de polímero, dentre outros (Caraballo, 2009).

A difusão é um exemplo de mecanismo de transporte de matéria onde um soluto é transportado devido aos movimentos das moléculas de um fluido, e resulta de movimentos moleculares aleatórios, que ocorrem em pequenas distâncias. Esse fenômeno pode ser descrito pela Lei de Fick. Num sistema difusivo, o fármaco pode estar revestido por uma membrana polimérica. Dessa forma, o solvente difunde-se na membrana, o fármaco dissolve-se e logo se difunde para fora do polímero. Este fenômeno é chamado de transporte caso I e está ilustrado na Figura 2.5. No entanto, a difusão em muitos polímeros não é adequadamente descrita por essa lei, devido ao solvente provocar no polímero grande aumento de volume.

A liberação do fármaco por erosão envolve dois processos sequenciais que são a difusão do solvente para o interior da matriz com consequente dilatação do material e formação de um gel e sua degradação. Esses processos podem ocorrer de modo mais ou menos simultâneos até a completa desagregação das cadeias poliméricas. Se a concentração do fármaco for menor que o limite de sua solubilidade na matriz, a taxa de liberação é controlada pela difusão. Por outro lado, se a concentração da droga estiver acima do limite de solubilidade na matriz, a taxa de liberação é controlada pela dissolução (Raval *et al.*, 2010).

Quando em contato com um solvente, as cadeias do polímero se desdobram, ocorre a transição entre o estado vítreo e o estado maleável (que está associado ao processo de absorção de fluido) e há a formação de uma camada de gel ao redor das áreas secas da matriz polimérica (Caraballo, 2009). Essa transição, chamada de transporte caso II, é observada quando a matriz aumenta seu volume devido à absorção e, implica em uma reorganização molecular das cadeias que tendem a alcançar uma nova condição de equilíbrio devido à presença do solvente (Colombo *et al.*, 2000).

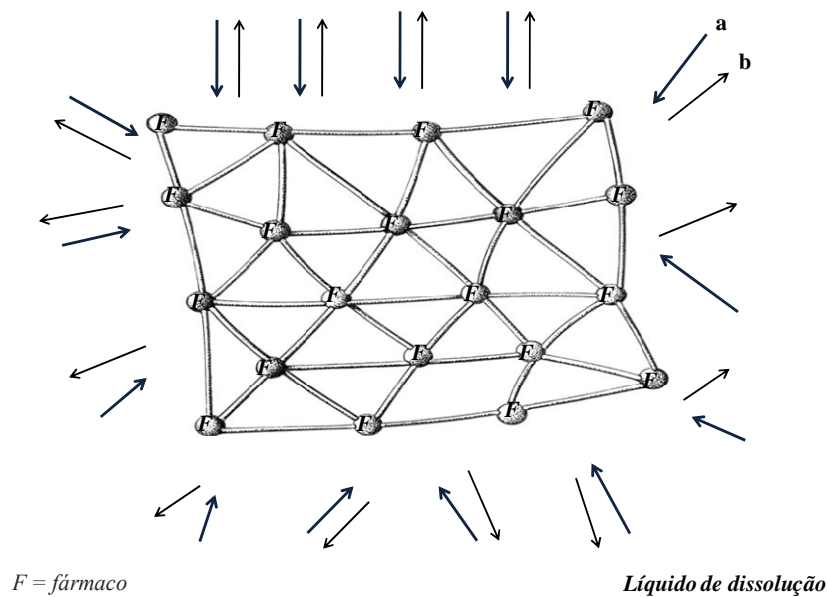


Figura 2.5 – Etapas de liberação do fármaco: a) penetração do líquido de dissolução nos poros do sistema matricial; b) difusão do fármaco dissolvido até o exterior da matriz.

Inicialmente, verifica-se um rápido aumento da espessura da camada de gel, decorrente da taxa de absorção de água, que é superior à velocidade de desagregação das cadeias do polímero. À medida que ocorre a hidratação do núcleo, são observadas pequenas mudanças na densidade da camada de gel, existindo uma sincronização entre os fenômenos de intumescimento e de desagregação das cadeias poliméricas. Finalmente, quando todo o polímero está hidratado na forma gelatinosa, ocorre apenas a desagregação das suas cadeias poliméricas, e, diante disso, o fenômeno de dispersão prevalece em relação aos outros fenômenos e a espessura diminui até desaparecer completamente a matriz gelificada. Esse fenômeno é representado por meio da Figura 2.6.

Anteriormente ao processo de dissolução, há a predominância das interações polímero-polímero e ocorre a configuração em que as cadeias poliméricas estão compactadas e completamente entrelaçadas umas nas outras. Nesta fase o fármaco encontra-se também aprisionado entre estas cadeias poliméricas, sendo mais lenta a sua liberação. O início da etapa de dissolução na camada limite de difusão conduz a um segundo tipo de rearranjo espacial, designado por semi-diluído. A concentração do solvente na matriz aumenta progressivamente e

verifica-se o afastamento das cadeias poliméricas em virtude do aumento das interações água-polímero. Nesta situação, ainda existem alguns pontos de interação entre as cadeias poliméricas e as partículas de fármaco circulam entre elas. Finalmente, o polímero assume uma terceira configuração macromolecular, designada por tipo diluído. Nesta configuração, as cadeias poliméricas estão completamente separadas umas das outras e dispersas no líquido de dissolução, perfeitamente individualizadas e movendo-se livremente com movimentos Brownianos. Neste momento, completa-se a liberação do fármaco restante ainda contido no interior da matriz para o líquido de dissolução (Lopes *et al.*, 2005). Esse processo é ilustrado na Figura 2.7

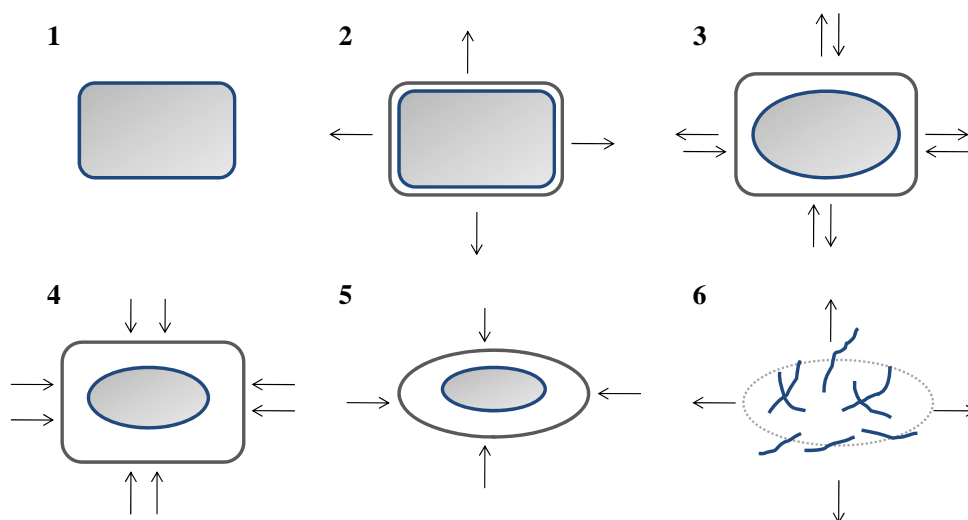


Figura 2.6 – Alterações observadas nos sistemas matriciais que intumescem e sofrem erosão: 1) matriz no estado seco; 2) início da hidratação, intumescimento da matriz e formação da camada de gel; 3 e 4) aumento da hidratação e intumescimento da matriz, diminuição do núcleo seco e início da erosão das cadeias poliméricas; 5) aumento da erosão das cadeias poliméricas; 6) separação das cadeias poliméricas com liberação do fármaco restante (adaptado de Lopes *et al.*, 2005).

Diante disso, a proposição de modelos matemáticos para a predição do comportamento cinético vem sendo um fator bastante estudado no desenvolvimento de dispositivos farmacêuticos de liberação controlada. Estes modelos apresentam inúmeros benefícios práticos, como a possibilidade de simular o efeito dos parâmetros delineados, a redução do número de

experimentos necessários para elucidar um dado comportamento, além de facilitarem o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Além disso, podem contribuir na descrição de equações de dissolução de fármacos e explicar a resistência da liberação do fármaco na presença da barreira de gel formada em torno da matriz.

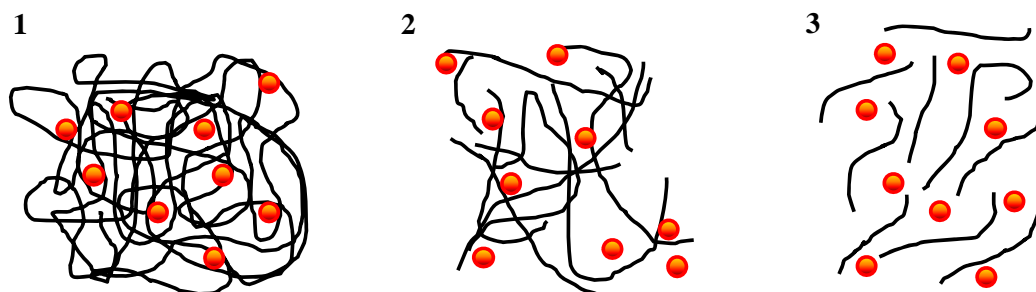


Figura 2.7 – Configurações dos polímeros no processo de dissolução do fármaco nas matrizes poliméricas: 1) as cadeias poliméricas estão completamente entrelaçadas; 2) rearranjo semi-diluído; 3) rearranjo do tipo diluído.

Conforme discutido por (Paul, 2010), Higuchi (1961) desenvolveu diversos modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e sólidas. Este autor propôs relações para descrever a dissolução das drogas em suspensão de pomadas, úteis também para outros tipos de dissolução de produtos farmacêuticos.

Segundo Higuchi (1961), uma matriz polimérica pode ser dividida em duas regiões, conforme ilustrado na Figura 2.8. A primeira região, na qual o fármaco se encontra em um estado não dissolvido e acumulado na forma de partículas, é verificada mais internamente à matriz. Neste caso, a espessura da matriz x é maior que dh . Já na segunda região, toda a droga está dissolvida (não há partículas), e x é menor que dh . Nesta segunda região verifica-se a ocorrência de um gradiente de concentração de fármaco que, pela Lei de Fick, controla sua taxa de liberação na solução (Paul, 2010).

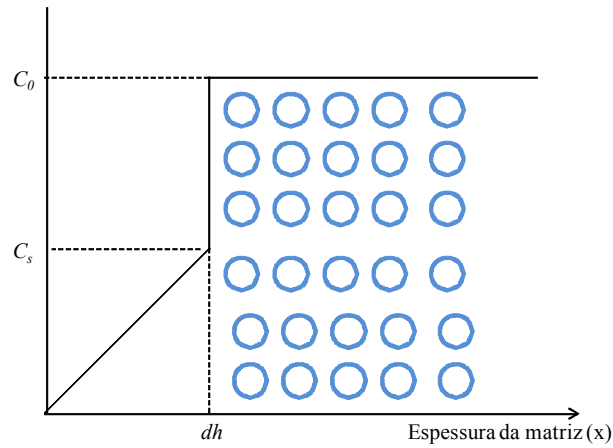


Figura 2.8: Ilustração esquemática do modelo proposto por Higuchi (1961), para o qual C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz seca, C_s é a solubilidade do fármaco na matriz polimérica, e h é a espessura da camada de difusão (adaptado de Paul, 2010).

Pode-se supor que as seguintes hipóteses são válidas para este sistema: (i) a concentração inicial do fármaco (C_0) na matriz é muito maior que a sua solubilidade (C_s), pressupondo-se a validade do estado pseudo-estacionário; (ii) a taxa de dissolução do fármaco na matriz é muito rápida quando comparada com a difusão do fármaco; (iii) o gradiente de concentração da droga dissolvida na matriz é constante, equivalendo à suposição do estado pseudo-estacionário, o que resulta em um perfil de concentração linear do fármaco dissolvido na matriz; (iv) a difusão é unidirecional; (v) o coeficiente de difusão do fármaco na matriz é constante; (vi) a distância entre as partículas do fármaco é menor que a espessura da matriz de liberação, o que reduz ou elimina o atraso para se alcançar o estado pseudo-estacionário; (vii) o intumescimento da matriz é desprezível, (viii) as condições do ambiente de liberação são ideais. A partir destas considerações e do balanço de massa para o fármaco no sistema, é possível descrever a liberação do fármaco através da Equação 1 (Higuchi, 1961):

$$dQ = (C_0 - C_s)dh + \frac{1}{2}C_s \cdot dh = C_0 \cdot dh - \frac{1}{2} \cdot (C_s \cdot dh) \quad (\text{Equação 1})$$

onde Q é a massa de fármaco liberada em um intervalo de tempo t .

A partir da primeira Lei de Fick, dada pela Equação 2, pode-se reescrever a Equação 1 na forma da Equação 3:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \cdot C_s}{h} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{2DC_s}{h(2C_0 - C_s)} \quad (\text{Equação 3})$$

onde D refere-se à constante de difusão do fármaco no seio da matriz intumescida.

Integrando-se a Equação 3, tem-se:

$$t = \frac{h^2}{4DC_s}(2C_0 - C_s) + k' \quad (\text{Equação 4})$$

onde k' é uma constante de integração que será nula se o tempo inicial (t_0) e a espessura inicial da camada de difusão (h_0) forem iguais a zero.

Considerando-se, então, $t_0 = 0$ e $h_0 = 0$, tem-se:

$$h = 2\sqrt{\frac{tDC_s}{2C_0 - C_s}} \quad (\text{Equação 5})$$

de forma que a quantidade de droga liberada no tempo t é dada por:

$$Q = C_0 \cdot h - \frac{1}{2} \cdot (C_s \cdot h) \quad (\text{Equação 6})$$

Substituindo a Equação 5 na Equação 6, tem-se:

$$Q = \sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t} \quad (\text{Equação 7})$$

Esta equação é válida durante todo o tempo de dissolução, exceto quando se atinge a total depleção do fármaco.

De uma forma geral, a equação de Higuchi expressa na forma da Equação 7 pode então ser simplificada para:

$$Q = K_h \cdot \sqrt{t} \quad (\text{Equação 8})$$

onde K_h corresponde à constante de liberação de Higuchi, que reflete as características da estrutura da formulação em termos da difusividade e solubilidade do fármaco da matriz (Higuchi, 1961, 1963).

Neste modelo, Q refere-se à massa do fármaco liberada em um intervalo de tempo t , C_s é a solubilidade do fármaco na matriz polimérica, C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz seca e h é a espessura da camada de difusão.

Um modelo alternativo foi proposto por Gibaldi e Feldman (1967) e, mais tarde, adaptado por Wagner (1969). Esse modelo tem sido utilizado para descrever a dissolução dos fármacos em um meio líquido e pode ser descrito pela Equação 9:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C) \quad (\text{Equação 9})$$

onde C é a concentração do fármaco na solução no tempo t , C_s é a solubilidade do fármaco no equilíbrio e K é uma constante de proporcionalidade de primeira ordem. Essa equação pode ser alterada para incorporar o valor da área sólida (S) acessível à dissolução:

$$\frac{dC}{dt} = KS(C_s - C) \quad (\text{Equação 10})$$

onde K_1 é uma nova constante de proporcionalidade. Utilizando a primeira lei de Fick, é possível estabelecer a constante K_1 pela relação:

$$K_1 = \frac{D}{Vh} \quad (\text{Equação 11})$$

onde D é o coeficiente de difusão na matriz intumescida, V é o volume do fluido de dissolução e h é a espessura da camada de difusão.

Hixson e Crowell (1931) adaptaram a Equação 9 para:

$$\frac{dQ}{dt} = K_1 S(C_s - C) \quad (\text{Equação 12})$$

onde dQ/dt é a taxa do soluto na solução e K é uma constante. A Equação 12 é obtida por meio da Equação 9 multiplicando ambos os termos por V e fazendo $K=K_1 V$. Comparando esses termos, a seguinte relação pode ser obtida:

$$K = \frac{D}{h} \quad (\text{Equação 13})$$

Diante disso, a Equação 12 pode ser reescrita como:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{KS}{V}(VC_s - Q) \quad (\text{Equação 14})$$

Integrando, tem-se a equação de primeira ordem:

$$Q = VC_s(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 15})$$

A difusão do fármaco em um sistema com geometria plana com espessura δ pode ser representada por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Equação 16})$$

onde D é o coeficiente de difusão (independente da concentração do fármaco). Se a liberação ocorrer em perfeitas condições de imersão, podem ser atribuídas as seguintes condições de contorno:

$$\begin{array}{lll} t = 0 & -\delta/2 < x < \delta/2 & C = C_0 \\ t > 0 & x = \pm \delta/2 & C = C_1 \end{array}$$

onde C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz seca e C_1 é a concentração da droga na interface polímero-solução. A solução desta equação sob essas condições de contorno é dada por:

$$Q = 2 \left(\frac{Dt}{\delta^2} \right)^{1/2} \left[\pi^{-1/2} + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n i \cdot \operatorname{erfc} \frac{n\delta}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad (\text{Equação 17})$$

Uma expressão suficientemente precisa pode ser obtida para valores baixos de t , uma vez que o segundo termo da equação se torna:

$$Q = 2 \left(\frac{Dt}{\delta^2} \right)^{1/2} \cdot \pi^{-1/2} \quad (\text{Equação 18})$$

Nesse sentido, Korsmeyer *et al.*(1983) desenvolveram um modelo simples e semi-empírico, baseado na Lei das Potências, que descreve a liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico (Equação 19). Esta equação é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte do fármaco no interior da matriz, que obedece às leis de Fick, e outro devido à consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semirrígido a outro mais flexível. Neste caso, o transporte é descrito como de comportamento anômalo e uma equação mais genérica pode ser utilizada:

$$Q = K_2 \cdot t^n \quad (\text{Equação 19})$$

onde Q é a massa de fármaco liberado no tempo t ; K_2 é a constante cinética da liberação e n é o expoente que caracteriza a cinética de liberação.

Peppas (1985) atribuiu diferentes valores de n para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. Quando n for menor ou igual a 0,5, a liberação é controlada por difusão. Quando n é igual a 1, a liberação do fármaco é controlada pelo intumescimento e corresponde à cinética de ordem zero. Neste caso, o processo de relaxamento das macromoléculas que ocorre por meio da embebição de água no sistema é o passo controlador. No caso de $0,5 < n < 1$, a liberação se dá por sobreposição dos dois fenômenos citados ou transporte anômalo.

Neste contexto, Peppas e Sahlin (1989) elaboraram um modelo matemático (Equação 20) que leva em consideração a difusão fickiana (primeiro termo da Equação 20) e a contribuição do relaxamento e intumescimento da matriz polimérica (segundo termo da Equação 20), onde m é o expoente que caracteriza a cinética de liberação e K_3 e K_4 são coeficientes relacionados à difusão fickiana e não fickiana, respectivamente.

$$Q = K_3 \cdot t^m + K_4 \cdot t^{2m} \quad (\text{Equação 20})$$

A análise dos diversos modelos descritos mostra que vários fatores devem ser considerados na incorporação de um fármaco em matrizes poliméricas visando à liberação controlada, desde as propriedades dos materiais envolvidos (polímeros e fármaco) e a forma de dispersão do composto até o modelo de transporte do agente ativo através da matriz. No presente trabalho, foi realizado um estudo experimental considerando a incorporação do AlphaSan[®] RC2000 em membranas de quitosana e alginato e sua liberação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Materiais*

Para a obtenção das membranas de quitosana-alginato incorporando AlphaSan[®] RC2000, os principais reagentes utilizados foram: quitosana de grau técnico obtida de carapaças de caranguejos com grau de desacetilação mínimo de 75% (Sigma-Aldrich, lote número 068K00851, com grau de desacetilação de 95%), alginato de sódio de baixa viscosidade obtido de *Macrocistis pirifera* (Sigma-Aldrich, lote número 076K0143), ácido acético glacial, AlphaSan[®] RC2000 (Milliken, gentilmente doado pela empresa LM Farma Indústria e Comércio Ltda. de São José dos Campos – SP), cloreto de cálcio diidratado e hidróxido de sódio da Merck. Além dos polissacarídeos de grau analítico da Sigma-Aldrich, testou-se também os materiais de grau farmacêutico: alginato de sódio e cálcio (Kelset[®]) e quitosana-S (Chitopharm-Cognis). Todos os outros reagentes empregados apresentavam qualidade analítica certificada.

A água que foi utilizada em todo o trabalho foi de alta pureza, consistindo em água destilada que foi posteriormente purificada em um sistema Milli-Q (Millipore). A água utilizada apresentava resistividade maior que 18,2 MΩ.cm a 25 °C e foi filtrada através de uma membrana com tamanho de poro de 0,22 µm.

3.2. *Metodologias*

3.2.1. *Preparação das membranas de quitosana-alginato contendo AlphaSan[®]*

Inicialmente foram preparadas as seguintes soluções a partir de polissacarídeos de grau analítico (Sigma-Aldrich), alginato de sódio 0,5% (m/v) em água deionizada, quitosana a 1% (m/v) em ácido acético glacial a 2% (v/v) diluído em água, NaOH a 1M e CaCl₂ a 2% (m/v) em água. Estas soluções foram armazenadas em geladeira por 24 horas antes do uso.

O procedimento utilizado é baseado na metodologia descrita por Rodrigues (2008) e adaptada por Bueno (2010). Colocou-se uma alíquota de 180 ml de solução aquosa a 0,5% (m/v)

de alginato em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm. A seguir, misturou-se uma alíquota de 90 ml de solução de quitosana a 1% (m/v) a 90 ml acetona. Esta mistura foi adicionada lentamente à solução de alginato com auxílio de uma bomba de infusão (ST 670 T, Samtronic), a uma vazão de 160 ml/h. Durante a adição, o sistema foi mantido sob agitação constante de 500 rpm e temperatura de 25 °C. O agitador utilizado era provido de uma hélice do tipo pás inclinadas de raio de 2,1 cm (Q-251 D, Quimis). Ao término do gotejamento, aumentou-se a taxa de agitação para 1000 rpm e a mistura foi agitada por mais 10 minutos. A seguir, adicionou-se 16,8 ml de NaOH a 1 M visando ajustar o pH para o valor de 5,28, mantendo-se a agitação do sistema por mais 10 minutos. Por fim, 3,6 ml de CaCl₂ a 2% (m/v) foram adicionados ao sistema, o qual permaneceu sob agitação por mais 10 minutos. O sistema utilizado para a produção do complexo polimérico encontra-se ilustrado na Figura 3.1.



Figura 3.1 – Sistema de produção do complexo polimérico.

Alternativamente, foram empregados polissacarídeos de distintas procedências e características, visando à substituição dos polímeros de grau analítico por materiais de grau farmacêutico. As formulações testadas estão descritas na Tabela 3.1. Destaca-se que a formulação 1 é a combinação padronizada utilizada na maioria dos ensaios, sendo considerada a formulação de referência.

Tabela 3.1: Composição das soluções aquosas empregadas para a preparação das membranas (alginato em água Milli-Q e quitosana em solução aquosa a 2% de ácido acético misturada com acetona na mesma proporção em volume).

Formulação	Alginato	Quitosana
1	0,5% Sigma-Aldrich	0,5% Sigma-Aldrich
2	0,5% Kel Set	0,5% Sigma-Aldrich
3	0,5% Kel Set	0,5% Cognis
4	0,25% Kel Set	0,5% Cognis
5	0,5% Sigma-Aldrich	0,5% Cognis

Para a incorporação do AlphaSan[®] RC2000 (a partir deste ponto denominado apenas como AlphaSan[®]), o mesmo foi adicionado na forma de pó à mistura contendo os complexos, em concentrações variando de 0 a 2% de prata em relação à massa total de polímeros presente na mistura. O sistema foi mantido sob agitação constante de 500 rpm à 20 °C durante 5 minutos. Após a adição do composto, todas as etapas foram realizadas sem a presença de luz direta, devido ao escurecimento da prata quando exposta à luz. Após a incorporação do AlphaSan[®], a suspensão de coacervados foi transferida para um kitassato e desaerada em bomba de vácuo (modelo Q-355B2, da Quimis) por 120 minutos. Em seguida, a mistura foi dividida igualmente em termos mássicos em duas placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro e levada a uma estufa com circulação de ar (modelo 410D, da Nova Ética) a 37 °C por 20 horas, sendo o fluxo de ar mantido igual sobre as membranas com auxílio de uma plataforma giratória com diâmetro de 25 cm (Autoart). Ao término da secagem, cada membrana foi imersa em 150 ml de CaCl₂ a 2% por uma hora. Para a retirada do CaCl₂ em excesso foram feitas mais duas imersões de uma hora em 200 ml de água deionizada. A secagem final foi realizada em temperatura ambiente por 24 horas.

3.2.2. Esterilização das membranas

As membranas obtidas ao final do processo foram esterilizadas na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP). No processo de esterilização utilizou-se vácuo inicial de 0,4 a 0,6 kgf/cm², temperatura de 50 °C e umidade relativa de 30 a 80%. Foi adicionado Oxyfume-30 (30% de óxido de etileno e 70% de dióxido de carbono) até a pressão da câmara atingir 0,5 kgf/cm². Após 3,5 horas de exposição, o vácuo foi reestabilizado (0,4 a 0,6 kgf/cm²) e as amostras foram expostas a ar filtrado por 10 minutos. O óxido de etileno residual foi removido mantendo as amostras sob aeração por 48 h.

3.2.3. Caracterização das membranas

As membranas obtidas foram caracterizadas de acordo com os procedimentos descritos a seguir, com base no trabalho de Rodrigues (2008). Cada ensaio foi realizado em pelo menos duplicata, a não ser em situações específicas explicitadas no texto.

3.2.3.1. Avaliação da espessura das membranas

A espessura das membranas secas foi medida com micrômetro Digimess por meio de medições em nove diferentes regiões de cada membrana.

Para a medida da espessura das membranas úmidas, um procedimento similar foi empregado, entretanto as amostras foram imersas em água Milli-Q, fluido corpóreo simulado (FCS) preparado de acordo com Kobubo *et al.* (1999) com composição descrita na Tabela 3.2, solução tampão PBS, soro fetal bovino (SFB, Nutricell) e solução de NaCl a 0,9% (m/v), à temperatura ambiente por um período de 24h.

Os resultados são apresentados como a média aritmética das medidas.

Tabela 3.2. Composição iônica do fluido corpóreo simulado e sua comparação com a constituição do plasma humano (Kokubo *et al.*, 1990).

Íon	Concentração (mM)	
	FCS	Plasma humano
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	148,8	103,0
HCO ³⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

3.2.3.2. *Morfologia da superfície e da secção transversal*

A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440 (Leica).

As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de 2 cm x 1 cm, com auxílio de um molde de vidro, e deixadas em dessecador por 24 horas. Após este período, as amostras foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter 40 coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Angstroms) em suas superfícies. Para a obtenção das imagens da secção transversal, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido antes de sua metalização.

3.2.3.3. *Ensaio de absorção de solução de cloreto de sódio e cálcio para curativos*

A absorção de solução de cloreto de sódio e cálcio das membranas de quitosana e alginato preparadas na ausência e na presença de prata foi determinada por meio do método AMS

LWILAB036, baseado na norma BSEN13726-1(2002) conforme informações fornecidas pela LM Farma Indústria e Comércio Ltda.

Para a determinação da absorção, amostras de 5 cm x 5cm foram inicialmente pesadas em balança analítica modelo TE214S (Quimis) e posteriormente imersas em 40 mL da solução aquosa de cloreto de sódio (8,298 g/L) e cloreto de cálcio (0,368 g/L) pré-aquecida a 37 °C. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos e, então foram novamente pesadas. A absorção, *Abs*, foi calculada por meio da Equação 21:

$$Abs = \frac{M_1 - M_0}{A} \quad (\text{Equação 21})$$

onde M_1 refere-se à massa final após 30 minutos de incubação, M_0 à massa inicial das membranas e A refere-se a área da amostra (largura x comprimento).

3.2.3.4. Perfil de intumescimento das membranas

O perfil de hidratação em diferentes fluidos foi determinado por meio do grau de intumescimento paulatino das membranas secas em água (pH 4,9), solução tampão PBS (pH 7,4), fluido corpóreo simulado (pH 7,4), soro fetal bovino (pH 7,2) e solução de NaCl 0,9% (m/v) (pH 5,5). As soluções tampão PBS e fluido corpóreo foram utilizadas a fim de expor as membranas a soluções com composição e concentração salina próximas à do corpo humano, porém livre de proteínas, enquanto que o soro fetal bovino simulava um ambiente mais complexo e mais próximo do sangue animal. Os ensaios com solução de NaCl devem-se ao fato de que usualmente, no tratamento de feridas utiliza-se soro fisiológico para a limpeza e hidratação das lesões.

Para a determinação do perfil de intumescimento, as membranas foram cortadas em corpos de prova retangulares de 2 cm x 1 cm e deixadas em dessecador por 24 horas. Estes foram pesados em balança analítica modelo TE214S (Quimis) e posteriormente hidratados com 10 mL de solução por períodos variando de 1 minuto a 24 h em estufa com circulação de ar modelo 410 (Nova Ética), a 37 °C. Após a hidratação, o excesso de solução foi removido com a ajuda de

papel de filtro, e os corpos de prova foram novamente pesados em balança analítica para a determinação da massa das amostras úmidas. Para cada período, o grau de intumescimento, C_i , foi determinado por meio da Equação 22.

$$C_i = \frac{M_i - M_0}{M_0} \quad (\text{Equação 22})$$

onde M_i refere-se à massa úmida no tempo i e M_0 refere-se à massa inicial das membranas.

3.2.3.5. *Avaliação da capacidade de drenagem de água*

As membranas foram hidratadas em água deionizada a 37°C por 2 h, e cortadas em amostras circulares de cerca de 2,0 cm de diâmetro. As amostras foram então dispostas na superfície de tubos plásticos de centrifuga (TPP) contendo 7 mL de água deionizada. Sobre as membranas foram colocados anéis de vedação para evitar vazamentos e, em seguida os tubos foram tampados com tampas plásticas com vão circular na parte superior, de aproximadamente 1,2 cm de diâmetro. Em um suporte de metal, os tubos foram colocados invertidos para que a água ficasse diretamente em contato com as membranas e suas bases foram perfuradas com agulhas para equalização da pressão, conforme indicado na Figura 3.2.

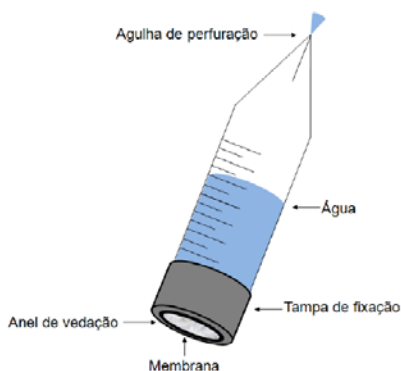


Figura 3.2 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de água das membranas (fonte: Rodrigues, 2008).

As amostras foram incubadas a 37 °C por 72h em um dessecador contendo sílica-gel. Os tubos foram pesados em tempos pré-determinados para avaliar a quantidade de água drenada pelas membranas. A taxa de drenagem (TD) foi determinada por meio da Equação 23.

$$TD = \frac{M_0 - M_f}{A \times t} \quad (\text{Equação 23})$$

onde M_0 é a massa inicial do sistema, M_f é a massa final após o período de drenagem, A é a área de contato da membrana com a água e t o tempo decorrido em dias.

3.2.3.6. *Avaliação da perda de massa das membranas expostas a vários fluidos*

O ensaio de perda de massa, visando analisar a estabilidade estrutural das membranas, foi realizado utilizando os cinco tipos de fluidos: água, fluido corpóreo simulado, solução salina, solução tampão PBS e soro fetal bovino.

Para a realização destes ensaios, as membranas foram cortadas em corpos de prova de dimensões 6 cm x 1 cm e deixadas em dessecador por 24 horas. Primeiramente, os corpos de prova foram pesados em balança analítica para determinação da sua massa inicial, sendo então imersos em 10 ml de solução por sete dias a 37 ° C. Após este período, as amostras foram retiradas, imersas em 20 mL de água Milli-Q durante 5 minutos, para remover sais ou proteínas adsorvidas (tal procedimento foi repetido por cinco vezes) e secas em estufa a 37 °C até atingirem massa seca constante. Após este período, as amostras foram armazenadas em dessecador por 24 h e então realizou-se a pesagem dos corpos de prova para a determinação da massa final. A perda de massa foi determinada por meio da Equação 24.

$$M_p = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 24})$$

onde M_i refere-se à massa inicial e M_f refere-se à massa final após o período de incubação nas soluções e posterior secagem.

3.2.3.7. *Análise das propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas das membranas referentes à resistência à tração e ao alongamento na ruptura foram determinadas com base em adaptações da norma ASTM D882. Estes ensaios foram realizados com as membranas secas, cortadas em corpos de prova de dimensões de 8 cm x 1 cm e deixadas em dessecador por 24 horas. Os corpos de prova foram fixados nas garras pneumáticas com mordentes de borracha do equipamento modelo H5K-S (Tinius Olsen), e alongados a uma taxa de deformação constante de 10 mm/min, com distância entre garras de 4,5 cm, utilizando-se uma célula de carga de 200 N. Os ensaios foram realizados com oito a dez corpos de prova para cada tipo de membrana, utilizando-se apenas os cinco resultados mais próximos entre si, visto que ocorrem muitas rupturas prematuras no material em decorrência da presença de bolhas não detectáveis a olho nu e a eventuais problemas de dispersão pouco homogênea dos complexos de alginato e quitosana e do AlphaSan[®] nas amostras.

3.2.3.8. *Avaliação de eficiência de incorporação da prata nas membranas*

A eficiência de incorporação foi determinada por meio da diferença entre a quantidade de prata inicialmente adicionada (0,05% a 2%) e a quantidade de prata presente na solução de CaCl₂ e na água utilizadas no processo reticulação secundária e de lavagem das membranas. Alíquotas de 10 mL foram retiradas e a quantidade de prata foi analisada por espectroscopia de absorção atômica (medidas realizadas na Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, SP). A porcentagem de incorporação em termos do composto AlphaSan[®] RC2000 foi calculada considerando que este contém 10% de prata em sua composição.

3.2.3.9. *Avaliação da cinética de liberação da prata das membranas*

Para a determinação da cinética de liberação da prata (das membranas preparadas na presença de 0,05% a 2% de prata), amostras de 2 cm x 2 cm foram cortadas e imersas em 10 mL de solução tampão PBS (pH 7,4) à 37 °C sob agitação de 100 rpm. Amostras foram periodicamente coletadas ao longo do ensaio, que teve duração total de 168 horas. Foram

utilizadas duas diferentes abordagens: na primeira, o tampão de imersão das amostras foi totalmente substituído em cada tempo de amostragem por PBS fresco, e na segunda, alíquotas de 0,1 mL foram coletadas ao longo do ensaio. No segundo caso, a cada período, o volume de amostra coletado foi substituído por uma quantidade equivalente de solução fresca de PBS. A quantificação da prata nas amostras coletadas foi feita utilizando-se espectroscopia de absorção atômica.

Os dados experimentais obtidos nos ensaios de liberação de prata com substituição parcial de PBS foram ajustados a vários modelos matemáticos visando analisar o comportamento cinético do sistema.

Os modelos utilizados foram os de Higuchi (1961), primeira ordem (1969), Korsmeyer *et al.* (1983), Peppas e Sahlin (1989) e um modelo proposto que combinava os modelos de primeira ordem (1969) e Korsmeyer *et al.* (1983), modelos estes apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Modelos matemáticos.

Modelo	Equação do modelo
Higuchi (1961)	$Q = K_h \cdot \sqrt{t}$
Primeira ordem (1969)	$Q = VC_s (1 - e^{-kt})$
Korsmeyer <i>et al.</i> (1983)	$Q = K_2 \cdot t^n$
Peppas e Sahlin (1989)	$Q = K_3 \cdot t^m + K_4 \cdot t^{2m}$
Proposto	$Q = VC_s (1 - e^{-kt}) + K_5 \cdot t^n$

O ajuste a cada modelo foi realizado utilizando a ferramenta *curve fitting* do programa Matlab[®] versão 2010a e, para a escolha do modelo que melhor se ajustava os dados de liberação de fármacos foi utilizado o método de análise do coeficiente de correlação R^2 . Contudo, o valor de R^2 tende a tornar-se maior com a adição de mais parâmetros. Por isso, quando se compara modelos com vários parâmetros, é mais apropriado utilizar o coeficiente de correlação ajustado Equação 25, descrito por Costa (2001).

$$R_{ajustado}^2 = 1 - \frac{(s-1)}{(s-p)} \cdot (1 - R^2) \quad (\text{Equação 25})$$

onde s é o número de pontos experimentais dos ensaios de liberação e p é o número de parâmetros do modelo. Dessa maneira, o modelo matemático que melhor descreve o perfil de liberação foi apontado como aquele que apresentou o maior coeficiente de correlação ajustado.

3.2.3.10. Análise do halo de inibição das membranas

Os testes foram realizados no Laboratório Controlbio (São Paulo, SP) de acordo com a norma ASTM G21-96, pelo menos em duplicata, empregando cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As bactérias foram repicadas em meio Tryptic Soy Agar e mantidas em estufa a 36 °C, durante 24 horas. Foi preparada uma suspensão equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônia (ufc) em 10 mL de água peptonada adicionada de Tween 80. A suspensão foi então incubada a 36 °C, durante 30 minutos. Corpos de prova de 4 cm x 4 cm foram colocados na superfície do meio de cultura Tryptic Soy Agar distribuído assepticamente em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, e incubados a 36 °C, durante 30 minutos. Após este período, inoculou-se sobre a superfície do meio de cultura 1 ml da suspensão microbiana. As leituras foram realizadas após 48 horas de incubação a 36 °C, estando indicada na Tabela 3.4 a forma de classificação da atividade antimicrobiana de acordo com o halo de inibição observado.

Tabela 3.4: Classificação da atividade antimicrobiana de acordo com o halo de inibição do crescimento celular.

Dimensão do halo de inibição	Classificação da atividade antimicrobiana
Crescimento intenso sobre ou sob o corpo de prova	Não aceitável (NA)
0 – 1 mm	Aceitável (A)
2 – 5 mm	Satisfatório (S)
≥ 6 mm	Altamente satisfatório (AS)

Foram utilizadas nestes ensaios apenas amostras das membranas de quitosana e alginato contendo 0% e 1,1% de prata. A escolha das membranas com concentração de 1,1% de prata foi feita devido a ser esta a concentração tipicamente encontrada em curativos comercialmente disponíveis. Por outro lado, as membranas isentas de prata foram escolhidas a fim de se comprovar que o efeito antimicrobiano não era resultante da quitosana e do alginato, mas apenas da prata presente na estrutura.

3.2.3.11. Citotoxicidade das membranas a fibroblastos

Os testes foram realizados por uma equipe especializada do Laboratório Medlab (São Paulo, SP) de acordo com a norma ASTM F895-84. A linhagem celular utilizada foi a NCTC Clone 929 de células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1).

As células foram inoculadas a uma densidade de 10^5 células/mL em placas de Petri e incubadas por 48 horas a 37 °C para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido foi substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio duas vezes concentrado e ágar com vermelho neutro. As amostras foram colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas foram novamente incubadas por 24h. Após este período, foi observado tanto a olho nu quanto por microscopia o Índice de Zona (IZ), que é a área não corada pelo corante vital. As amostras foram testadas em quadruplicatas em placas separadas. A avaliação da citotoxicidade das membranas foi analisada por meio da Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Classificação dos níveis de citotoxicidade de acordo com a análise do IZ.

Aspecto	Classificação	IZ
Nenhuma zona sob ou ao redor da amostra	Nenhuma	0
Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca	1
Zona limitada sob a amostra	Leve	2
Zona limitada entre 0,5 a 1 cm ao redor da amostra	Moderada	3
Zona superior a 1 cm ao redor da amostra	Severa	4

3.2.3.12. Avaliação quanto à irritabilidade e corrosão dérmica

Estes testes foram realizados no Laboratório Medlab (São Paulo, SP). O objetivo do estudo de irritabilidade e corrosão dérmica foi avaliar a derme do sistema teste (coelhos) após aplicação única das membranas, verificando em intervalos específicos os possíveis efeitos de corrosão/irritação das substâncias.

No sistema-teste do estudo de irritabilidade e corrosão dérmica foram empregados três coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos da raça Nova Zelândia, adultos, machos/fêmeas, saudáveis, sem lesões externas e sem alterações patológicas detectáveis na pele dos animais. Para a realização desta análise os coelhos liberados foram avaliados pelo veterinário quando de sua chegada e aprovados para utilização em estudos. Os coelhos foram alojados em gaiolas individuais, de acordo com normas e legislações vigentes, para garantir a integridade e o bem-estar dos animais. Estes foram mantidos em sala com temperatura entre 19° e 25°C e umidade relativa do ar entre 30 e 70%, e cumpriram fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. A alimentação dos coelhos foi composta de ração convencional para a espécie e água potável *ad libitum*.

O teste foi conduzido segundo as normas 404 da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) (2002), e 65.3330.003 do Instituto Nacional para Controle de Qualidade em Saúde, Irritação Dérmica Primária, Revisão 06 (2007). Não foi utilizado nenhum tipo de substância de referência para a realização deste estudo (OECD, 2002). Foi considerada como referência de não irritabilidade ou corrosão a área da derme do coelho saudável que não foi submetida à aplicação das membranas (controle negativo).

Para a aplicação das membranas, os coelhos selecionados foram previamente depilados antes da aplicação, na região dorsal, com otosador, tomando-se o cuidado de não causar lesões ou irritação na pele. Foram utilizados somente os animais que apresentaram a derme intacta após a depilação.

As membranas foram cortadas nas medidas de 2,5 cm x 2,5 cm, umedecidas, à saturação, com 0,5 mL de solução fisiológica (0,9% de NaCl) e colocadas em frasco com tampa para posterior aplicação nos animais selecionados e aclimatizados para a realização deste ensaio.

As membranas foram aplicadas topicamente uma única vez, e cobertas com gaze e fita adesiva (*patch*) nos 3 animais selecionados para a realização do estudo e ficaram em contato com a pele dos animais por 4 horas. Após este período de exposição, o excesso de material foi retirado com água purificada / solução fisiológica e cotonete.

Todos os animais foram observados no período de 60 minutos, 24, 48 e 72 horas após a remoção do *patch* e a graduação de edemas (acúmulo anormal de líquido no espaço intersticial) e eritemas (coloração avermelhada da pele ocasionada por vasodilatação capilar, sendo um sinal típico de inflamação) foi feita de acordo com as Tabelas 3.6 e 3.7, respectivamente.

Tabela 3.6: Graduação para reações de eritema.

Eritema	Grau
Sem a presença de eritema	0
Eritema ligeiramente perceptível	1
Eritema bem definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema severo com formação de escamas	4

Tabela 3.7: Graduação para reações de edemas.

Edema	Grau
Sem a presença de edema	0
Edema ligeiramente perceptível	1
Edema discreto	2
Edema moderado (aproximadamente 1mm)	3
Edema severo (maior que 1mm)	4

A classificação de irritabilidade dérmica do produto é feita com base na média dos resultados obtidos por meio da soma dos dados das reações de edemas e eritemas e analisada de acordo com a Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Classificação dos produtos quanto ao grau de irritabilidade dérmica.

Classificação	Grau
Não irritante	0,00 – 0,99
Ligeiramente irritante	1,00 – 1,99
Moderadamente irritante	2,00 – 4,99
Severamente irritante	5,00 – 8,00

3.2.3.13. Sensibilização dérmica

O objetivo desse ensaio foi avaliar o potencial das membranas serem alergênicas (sensibilizante) ao organismo, após várias exposições na derme do sistema-teste, quando estimulada com adjuvante. O teste foi conduzido segundo as normas 406 da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), 1992.

O sistema-teste do estudo de Sensibilização Dérmica Maximizada foi formado por 20 cobaias (*Cavia porcellus*) albinas, adultos, machos/fêmeas, saudáveis, sem lesões externas e sem alterações patológicas detectáveis na pele dos animais. Para este estudo foram utilizadas cobaias por apresentarem maior sensibilidade e estar de acordo com o protocolo descrito no método. As cobaias saudáveis, com peso corpóreo entre 300 e 400 g foram previamente avaliadas pelo veterinário e aprovadas para uso. Os animais foram alojados em caixas sob as mesmas condições descritas do teste de irritabilidade dérmica e sua alimentação foi composta de ração convencional para a espécie e água potável.

As vinte cobaias foram depiladas 24 horas antes da aplicação das membranas, na região dorsal direita, com o cuidado de não causar lesões ou irritação na pele. Assim como descrito no

ensaio anterior, foram utilizados somente animais que apresentavam a derme intacta após a depilação.

As membranas foram umedecidas, à saturação, com solução fisiológica e colocadas em frasco de vidro com tampa para posterior aplicação nos animais selecionados, aclimatizados para a realização deste estudo. Como substância de referência (controle negativo de sensibilização dérmica) foi utilizada solução aquosa de cloreto de sódio 0,9%.

O ensaio consistiu em duas etapas, sendo a primeira a fase de indução e a segunda, a fase de desafio. Inicialmente, na fase de indução, os 20 animais foram divididos em 3 grupos: grupo-teste composto por 10 animais, grupo controle I com 5 animais e grupo controle II com 5 animais. Na primeira e na décima aplicação das amostras, todos os animais receberam uma injeção intradérmica de adjuvante complexo de Freund (0,1 mL). O grupo controle I recebeu solução de 0,9% de cloreto de sódio e nos grupos teste e controle II, aplicou-se as membranas (com gaze e fita adesiva) topicamente com 48 h de intervalo, totalizando 10 aplicações. O tratamento foi suspenso entre o 24º e o 35º dia (inclusive), considerando-se ser este o tempo necessário para que o organismo produzisse a resposta imunológica.

Na fase de desafio, os animais foram tricotomizados no 36º dia (a lateral dorsal esquerda) e então, as membranas foram aplicadas topicamente nos animais do grupo teste e do grupo controle I e ficaram em contato com a derme dos animais por 48h. Os animais do grupo controle II receberam topicamente 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. As análises ocorreram 1, 6, 24 e 48 horas após a retirada das membranas dos animais do grupo teste e do grupo controle I. A graduação das reações foi feita de acordo com a Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Graduação de reações para o teste de sensibilidade dérmica.

Reações	Graduação
Sem alteração na área teste	0
Eritema discreto	1
Eritema moderado	2
Eritema intenso	3

3.2.4. Análises estatísticas

Sempre que possível, os dados foram apresentados como o valor médio obtido a partir de, no mínimo, dois ensaios independentes. Os desvios padrões foram calculados por meio do programa *Microsoft Excel*, versão 2007. A análise de significância estatística das diferenças com base em um limite de confiança de 95% foi realizada segundo os testes de comparação de médias de Tukey, efetuada por meio do programa *Statistica 7[®]*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho. Exceto quando indicado, as membranas foram preparadas a partir de soluções de alginato e quitosana provenientes da empresa Sigma-Aldrich.

4.1. *Aspecto das membranas*

A Figura 4.1 mostra o aspecto típico, avaliado a olho nu, das membranas com proporções variadas de prata.

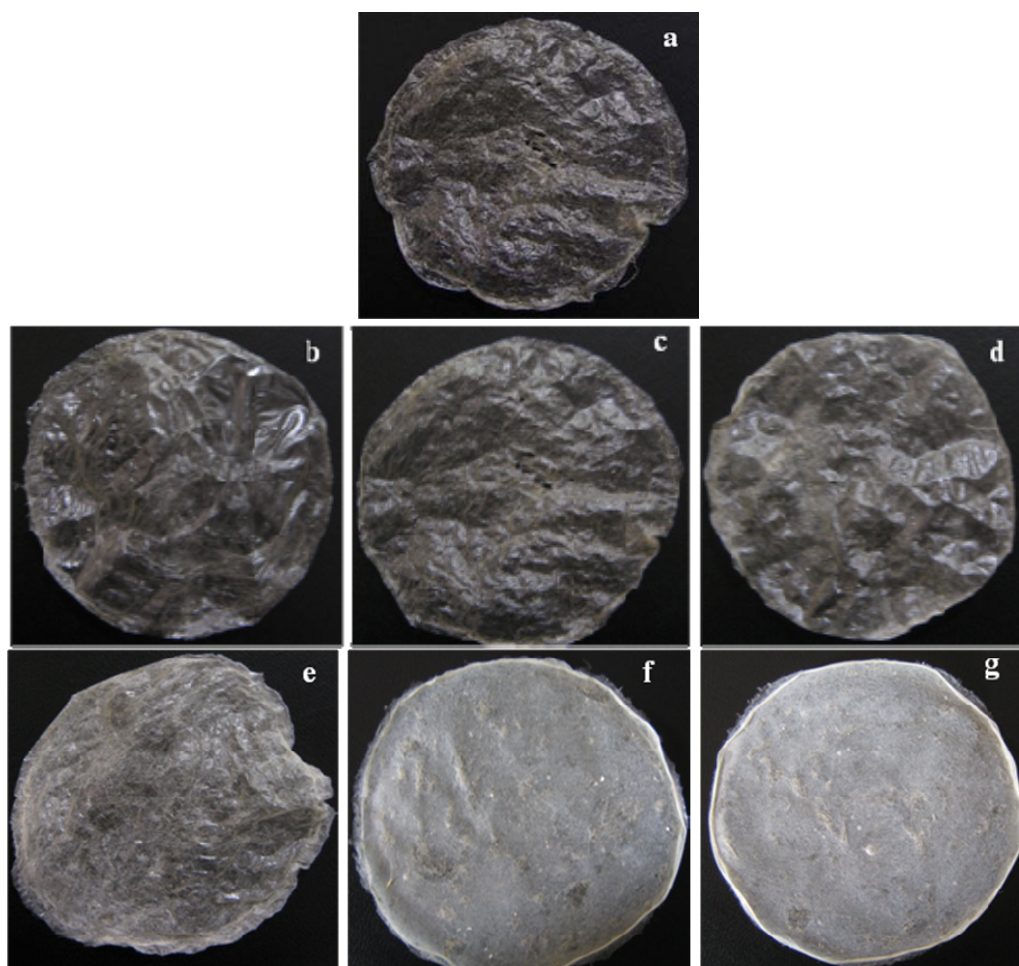


Figura 4.1 - Membranas sem prata (a) e preparadas na presença de 0,05% (b), 0,1%, (c), 2% (d), 0,6, (e), 1,1% (f), 2% (g) de prata. Diâmetro das membranas de cerca de 12 cm.

Como o complexo polimérico com AlphaSan[®] apresentou aspecto uniforme e esbranquiçado, membranas também esbranquiçadas foram observadas. Nota-se a olho nu que o AlphaSan[®] distribuiu-se praticamente de forma homogênea nas membranas. Foi observado também que com o aumento da concentração de prata, as membranas tornaram-se mais opacas e sensíveis à luz. No entanto, no trabalho de Qin (2005) com fibras de alginato e AlphaSan[®], o autor afirma que a estrutura do composto de fosfato hidrogenado de zircônio e sódio impede com que os íons prata se reduzam e as fibras escureçam. Diante disso, uma possível causa para o escurecimento das membranas seja a formação de cloreto de prata, produto da reação da prata presente na estrutura do AlphaSan[®] com a solução de cloreto de cálcio utilizado nos processos de reticulação iônica. Da mesma maneira que o AlphaSan[®], o cloreto de prata é praticamente insolúvel em água. Além disso, este sal se decompõe por meio de fotólise (Reação 1) originando o metal finamente dividido, que é negro (Filgueiras, 1996). Da mesma maneira, Qin (2005) constatou que ao tratar fibras de alginato de cálcio com nitrato de prata e cloreto de cálcio, as fibras, quando expostas à luz, ficaram escuras. Devido a essa sensibilidade à luz, após a etapa de adição do AlphaSan[®], todos os procedimentos subsequentes foram feitos sob luz indireta.



4.2. Morfologia das membranas contendo AlphaSan[®]

Na Figura 4.2 estão apresentadas as morfologias de superfície típicas das membranas de quitosana e alginato incorporando ou não AlphaSan[®]. Foi observado (Figura 4.2a) que a membrana constituída apenas por quitosana e alginato apresentou superfície ondulada, com elevações e fibras distribuídas ao longo de sua extensão, não sendo observada a presença de poros em aumentos de até 5000 vezes. Este aspecto foi também observado por Rodrigues (2008) e Bueno (2010) para membranas compostas pelos mesmos polissacarídeos.

Nas imagens restantes (Figura 4.2b a 4.2g), observa-se um aumento na rugosidade e do número de partículas na superfície da membrana. Rodrigues (2008) observou em seus estudos com membranas incorporando bacitracina por impregnação em solução a deposição de partículas na membrana, entretanto afirma que isso pode ser decorrente também dos sais do tampão

utilizado na diluição e não só propriamente do fármaco, fato este que não ocorreu no presente estudo, uma vez que o AlphaSan[®] foi adicionado em pó à suspensão do complexo polimérico e após a secagem, as membranas foram submetidas a vários processos de lavagem.

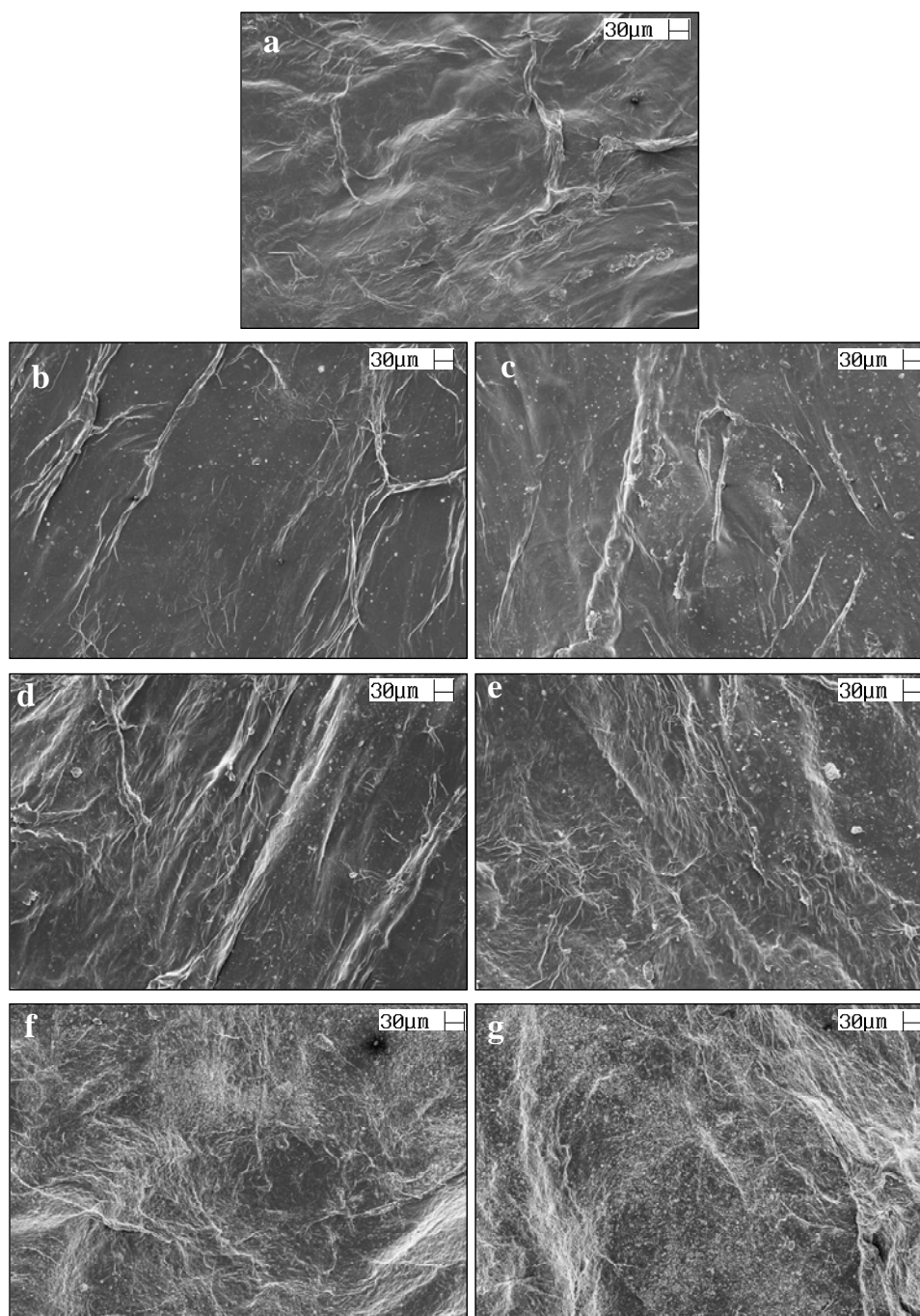


Figura 4.2 - Morfologia de superfície das membranas sem prata (a) e preparadas na presença de 0,05% (b), 0,1% (c), 2% (d), 0,6 (e), 1,1% (f) e 2% (g) de prata.

Os cortes transversais das membranas contendo ou não o agente antimicrobiano são apresentados na Figura 4.3.

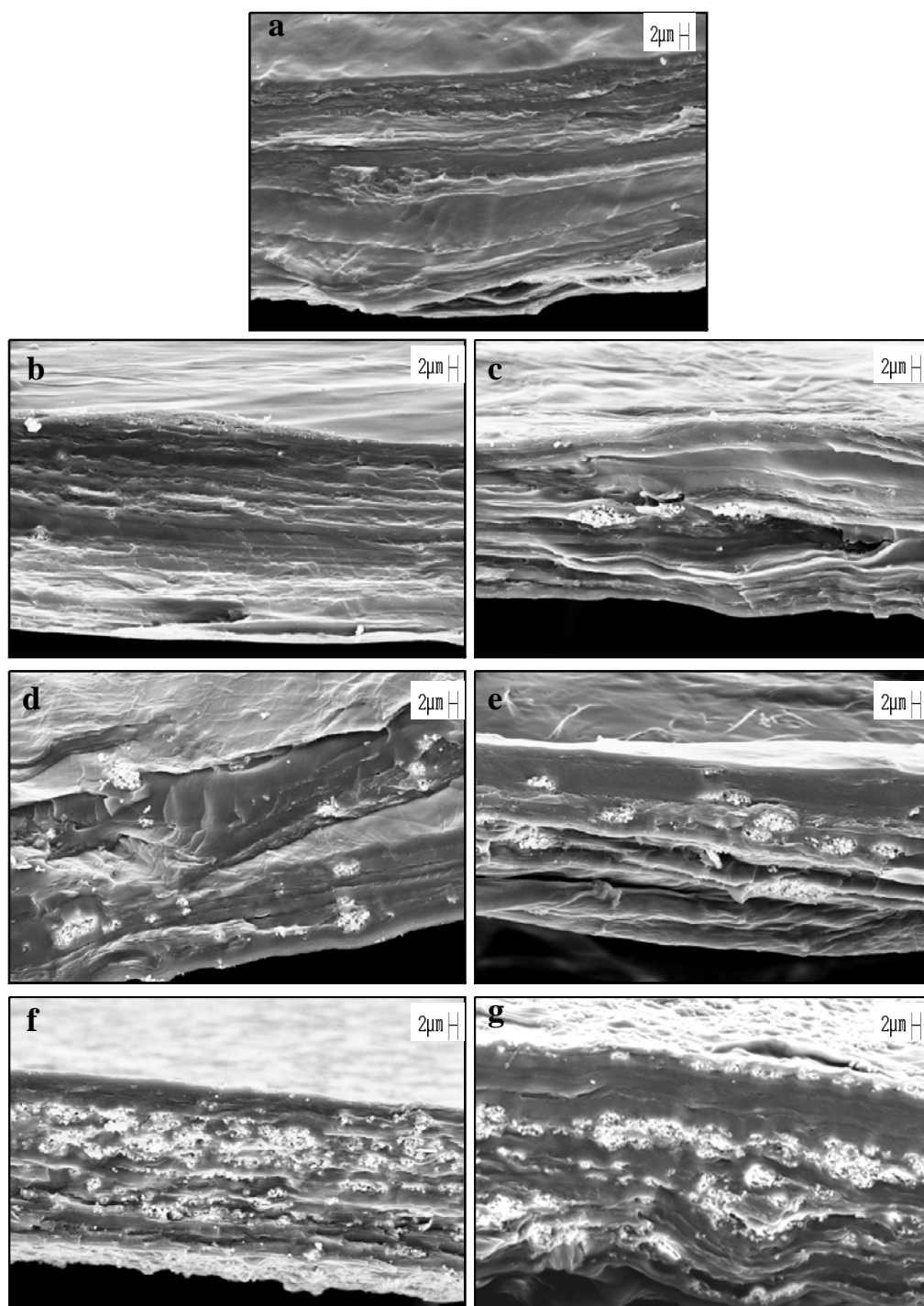


Figura 4.3 - Corte transversal das membranas (a) sem prata e preparadas na presença de (b) 0,05%, (c) 0,1%, (d) 2% (e) 0,6, (f) 1,1% e (g) 2% de prata.

Foram constatados pontos de aglomeração das partículas de AlphaSan[®], indicando que o material não foi uniformemente distribuído na matriz de alginato e quitosana, apesar de se ter esta impressão na análise a olho nu. Foi cogitada à hipótese de se adicionar o AlphaSan[®] à mistura polissacarídica na forma de solução para melhorar sua distribuição na matriz. Entretanto, como a solubilidade deste composto em soluções aquosas é muito pequena descartou-se tal idéia, pois haveria, provavelmente, grandes perdas do material nas paredes do frasco usado na transferência. Além disso, tal aglomeração pode ter também decorrido de segregação de fases durante o processo de secagem das membranas, que é bastante lento.

À medida que se aumentou a concentração do AlphaSan[®], foi observado um aumento no número das lamelas e isso, conjuntamente com o efeito do aumento de massa dos dispositivos pela adição do agente antimicrobiano, refletiu em um aumento de espessura das membranas, resultado este mais detalhadamente discutido a seguir.

4.3. *Espessura das membranas*

Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados da análise de espessura das amostras secas e úmidas.

As membranas poliméricas utilizadas neste trabalho apresentaram espessura variando de 87 a 520 µm no estado seco, e de 116 a 2199 µm no estado úmido.

As membranas contendo AlphaSan[®] mostraram-se mais espessas tanto no estado seco quanto no estado úmido. Por meio da microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar que o agente antimicrobiano está localizado tanto na forma dispersa quanto entre as fibras poliméricas de quitosana e alginato, ocasionando o aumento na espessura das membranas.

Observa-se que os maiores valores de espessura das amostras hidratadas foram obtidos em água. Bartkowiak (2002) e Bueno (2010) afirmam que o menor aumento da espessura das membranas quando imersas nos demais fluidos está relacionada com a força iônica e a osmolalidade do meio, pois quanto maior a concentração iônica, maior é o efeito de blindagem de cargas dos polímeros e conseqüentemente, haverá uma maior compactação da estrutura na

presença do solvente, e quanto maior o número de espécies hidratáveis, maior será a competição pela água de hidratação.

Tabela 4.1: Espessura das membranas de quitosana e alginato secas e após exposição a água, SS, PBS, FCS e SFB a 37°C por 24 h preparadas na ausência ou presença de prata.

Conc. de prata (%)	Espessura (µm)					
	Com umidade em equilíbrio com a do ambiente	Água	SS	PBS	FCS	SFB
0,00	87 ± 2 ^{a,A}	450 ± 15 ^{a,B}	138 ± 8 ^{a,C}	139 ± 7 ^{a,C}	140 ± 9 ^{a,C}	116 ± 8 ^{a,D}
0,05	94 ± 2 ^{a,A}	467 ± 10 ^{a,B}	143 ± 7 ^{b,C}	156 ± 10 ^{a,C}	165 ± 17 ^{a,C}	135 ± 5 ^{b,D}
0,10	140 ± 13 ^{b,A}	675 ± 10 ^{b,B}	320 ± 9 ^{c,C}	281 ± 5 ^{b,D}	268 ± 10 ^{b,E}	190 ± 8 ^{c,F}
0,20	180 ± 10 ^{c,A}	725 ± 13 ^{c,B}	443 ± 10 ^{d,C}	398 ± 3 ^{c,D}	327 ± 5 ^{c,D}	285 ± 13 ^{d,E}
0,60	350 ± 11 ^{d,A}	1650 ± 18 ^{d,B}	797 ± 12 ^{e,C}	792 ± 7 ^{d,C}	782 ± 12 ^{d,C}	830 ± 3 ^{e,D}
1,10	420 ± 15 ^{e,A}	1710 ± 49 ^{e,B}	904 ± 25 ^{f,C}	1100 ± 10 ^{e,D}	1525 ± 22 ^{e,E}	998 ± 25 ^{f,F}
2,00	520 ± 19 ^{f,A}	2199 ± 68 ^{f,B}	1050 ± 2 ^{g,C}	1230 ± 11 ^{f,D}	1791 ± 15 ^{f,E}	1158 ± 27 ^{g,F}

Resultados com letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa. Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança para membranas preparadas com a mesma concentração inicial de prata.

No entanto, embora a força iônica do FCS e a solução tampão PBS sejam maiores que da SS, nas membranas contendo 0,1%, 0,2% e 0,6% de prata foi observado um aumento da espessura quando a membrana foi exposta à solução de menor força iônica (SS). Meng *et al.* (2010) propõem que o equilíbrio das cargas entre os grupos amino da quitosana e carboxílicos do alginato é afetado pelas variações de pH. Após a imersão das membranas, o fluido corpóreo simulado apresentou um pH de 7,1 enquanto que a solução salina um pH de 5,2. Essa alteração do pH do meio, provavelmente deve-se à presença de ácido acético residual nas membranas, uma vez que este é adicionado durante o processo de produção a fim de se solubilizar a quitosana e pode não ter sido completamente removido nas etapas de lavagem. Esta redução de pH pode eventualmente trazer efeitos negativos para o paciente e também afetar a cinética de liberação da

prata, entretanto a influência dessa variável não foi avaliada neste trabalho. Dessa maneira, em condições de pH inferiores ao pKa da quitosana, que é o caso da solução salina, a protonação seguida da repulsão eletrostática dos grupos amino facilita a absorção de água, o que causa uma maior expansão da membrana do que na solução de pH 7,1 (FCS).

Assim, é perceptível que a força iônica e o pH das soluções são fatores que afetam a espessura das membranas de quitosana e alginato com diferentes concentrações de prata hidratadas.

4.4. Capacidade de absorção

De acordo com a literatura técnica fornecida pela empresa LM Farma, soluções aquosas contendo simultaneamente NaCl (a 8,298g/L) e CaCl₂ (0,368g/L) são comumente empregadas para a análise da capacidade de absorção de fluidos por curativos. Os dados obtidos neste ensaio para as membranas produzidas estão indicados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Capacidade de absorção de solução de NaCl e CaCl₂ das membranas livres ou contendo prata em diferentes proporções iniciais.

Concentração de prata (%)	Absorção (g/100cm ²)
0	14,1 ± 0,1 ^a
0,05	15,2 ± 0,9 ^b
0,10	15,9 ± 0,9 ^b
0,20	16,1 ± 0,8 ^b
0,60	16,7 ± 0,4 ^b
1,10	17,3 ± 0,5 ^b
2,00	17,1 ± 0,3 ^b

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

Nota-se que as membranas de quitosana e alginato isentas de agente antimicrobiano apresentam valores ligeiramente inferiores de absorção em comparação com as preparadas na presença do agente ativo. Conforme já mencionado, membranas contendo AlphaSan® têm lamelas mais espaçadas, o que facilita a entrada da solução, aumentando sua capacidade de absorção.

Comparativamente, as membranas que contêm maiores quantidades de prata apresentaram valores de absorção menores que o relatado para o curativo comercialmente disponível Aquacel Ag (igual a 20 g/100cm²), produzido pela ConvaTec, indicado para feridas altamente exudativas.

Com base nestes resultados, verifica-se que as membranas obtidas (contendo 0,05% a 2% de AlphaSan) são indicadas para lesões com moderada produção de exsudato.

4.5. Perfil de intumescimento de fluidos pelas membranas

Os perfis de intumescimento das membranas em água, solução salina, solução tampão PBS, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino estão apresentados nas Figuras 4.4 a 4.8, respectivamente. Destaca-se que tais soluções apresentam composições mais próximas as verificadas nas condições de uso *in vivo* e por esta razão foram empregadas no estudo detalhado do perfil de absorção ao invés da solução contendo 8,298 g/L de NaCl e 0,368g/L de CaCl₂ em água, que é usada como solução de referência na análise de curativos industrializados.

Observa-se que as membranas preparadas na presença de maiores concentrações de prata apresentaram maior capacidade de intumescimento. Mais uma vez, isso corrobora a hipótese de que as membranas com maiores concentrações devido as suas maiores espessuras apresentam maior número de lamelas, e com isso a penetração das soluções é facilitada, aumentando a capacidade de intumescimento.

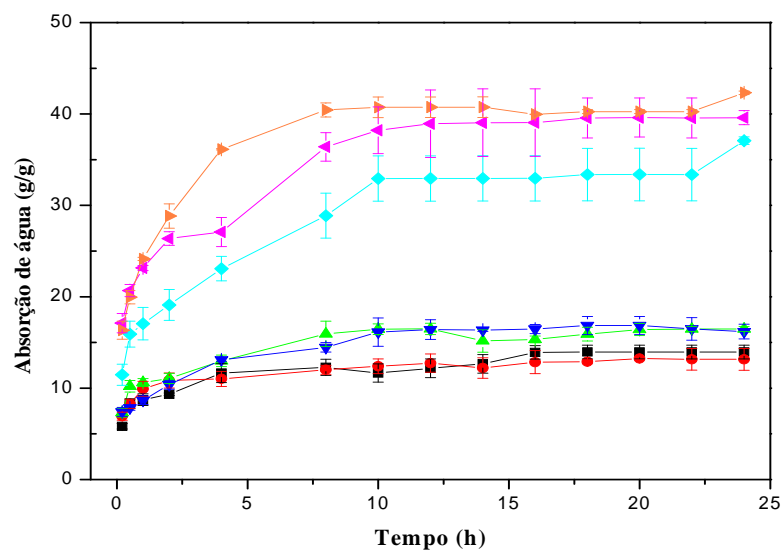


Figura 4.4 – Perfil de intumescimento em água das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata.

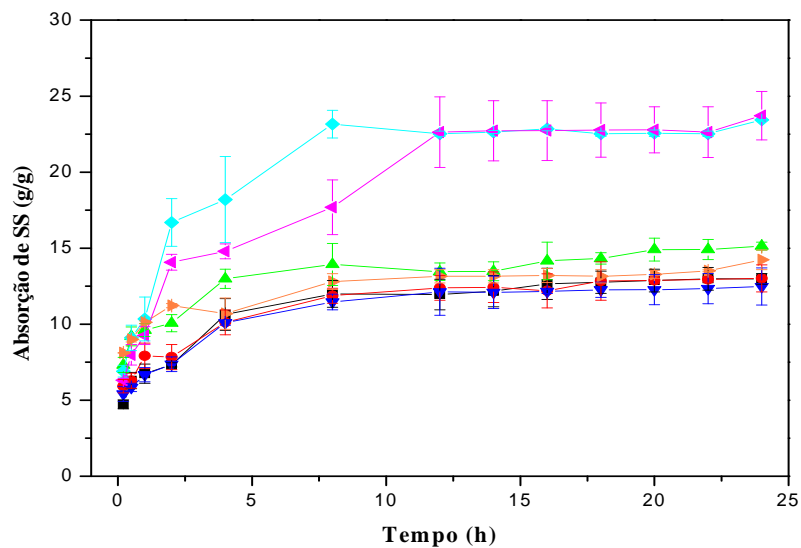


Figura 4.5 - Perfil de intumescimento em solução salina das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata.

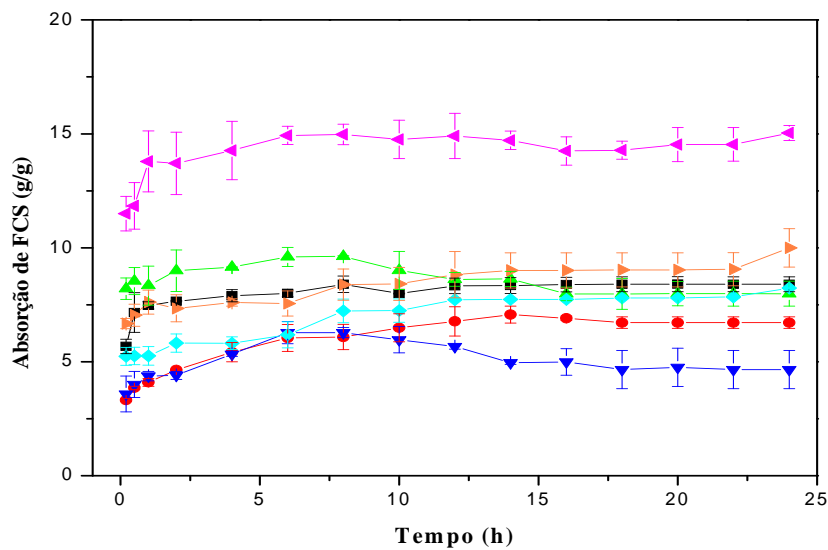


Figura 4.6 – Perfil de intumescimento em fluido corpóreo simulado das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata.

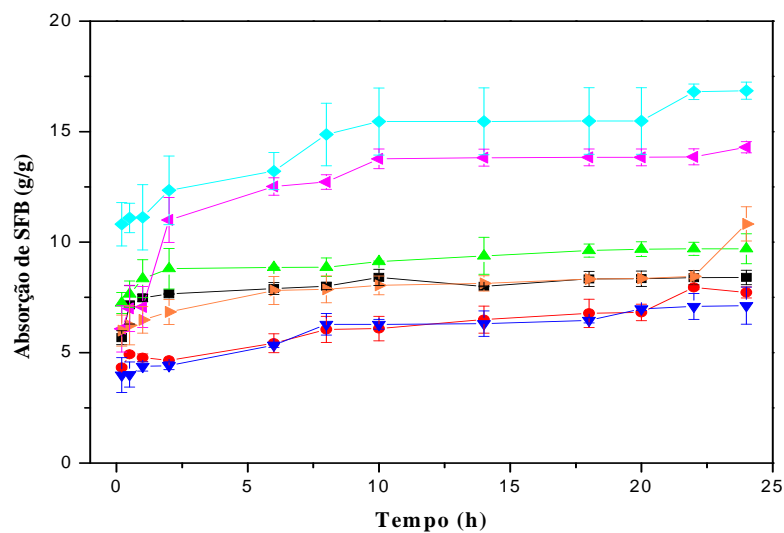


Figura 4.7 – Perfil de intumescimento em soro fetal bovino das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata.

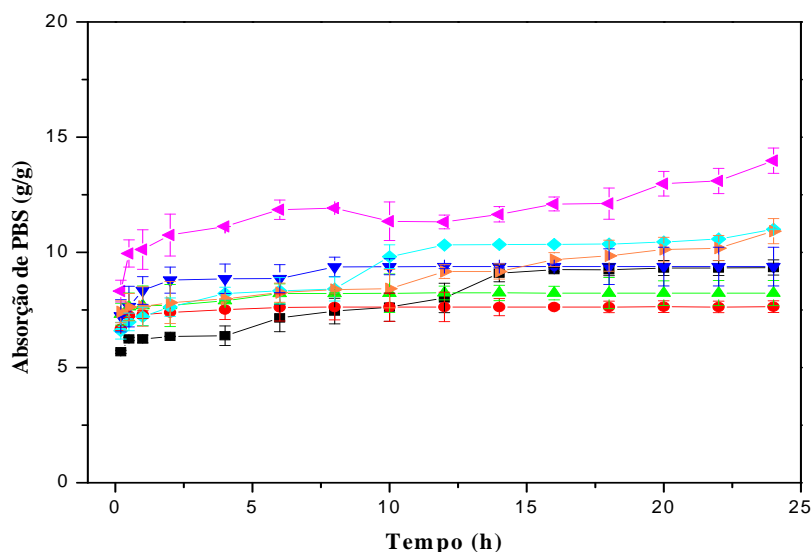


Figura 4.8 – Perfil de intumescimento em solução PBS das membranas de quitosana e alginato: (■) isentas de prata e preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata.

Os perfis de intumescimento das membranas imersas em todos os fluidos (água, solução salina, solução PBS, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino) são semelhantes, ou seja, as amostras apresentam altas taxas de intumescimento nas primeiras horas e períodos em que a absorção é praticamente constante. Além disso, as curvas apresentam em um determinado tempo um discreto aumento na absorção. Isso pode ser atribuído à expansão das cadeias dos polímeros que constituem a membrana ou ainda à dissolução das mesmas, uma vez que em valores de pH baixos como o da água deionizada (pH=4,9) ou solução salina (pH=5,5) as ligações entre os polímeros podem ser rompidas, resultando na desintegração dos PECs e na dissolução parcial das membranas (Bernabé *et al.*, 2005).

Ainda comparando os perfis de intumescimento, nota-se que os maiores valores verificados em 24 h são encontrados para as membranas imersas em água, seguidos daquelas em contato com SS. Maurstad *et al.* (2008) propõem que com o aumento da força iônica, os polieletrólitos livres tendem a adotar uma conformação espiralada, resultando em uma menor repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas. Como consequência deste efeito, tem-se uma estrutura mais empacotada, o que dificulta a penetração de água nas membranas.

Nos demais fluidos (PBS, FCS e SFB) nota-se que os valores não diferiram significativamente. Na Tabela 4.3 são apontados os valores finais de absorção após 24 h de contato das amostras com as soluções.

O fato de se ter obtido valores de capacidade de intumescimento maiores em água e solução salina do que nos demais fluidos pode ser explicado devido ao pH das soluções. Em meios ácidos como a água deionizada utilizada (pH=4,9) e a solução salina (pH=5,5), a protonação seguida do afastamento dos grupos amino residuais do complexo polieletrólito pode causar uma expansão da estrutura polimérica, facilitando a penetração e a absorção de água. De acordo com Yan *et al.* (2000), a presença de grupos amino protonados nos filmes aumenta a capacidade de absorção de água. Ainda neste sentido, Rodrigues (2008) afirma que durante o intumescimento, pequenos íons presentes na rede polimérica podem deixar a membrana, diminuindo a pressão osmótica e, em pH próximo de 5, os grupos carboxílicos livres provenientes do alginato estariam mais freqüentemente presentes na forma de carboxilato, favorecendo a formação de pontes de hidrogênio.

Tabela 4.3: Grau de intumescimento das membranas em água, SS, PBS, FCS e SFB em 24 h.

Conc. Prata (%)	Grau de intumescimento (g/g)				
	Água	SS	PBS	FCS	SFB
0,00	13,9 ± 0,8 ^{a,A}	13,0 ± 0,3 ^{f,A}	9,3 ± 0,3 ^{i,B}	9,2 ± 0,2 ^{m,B}	8,4 ± 0,3 ^{q,B}
0,05	13,2 ± 1,2 ^{a,C}	13,0 ± 0,9 ^{f,C}	7,6 ± 0,3 ^{j,D}	7,2 ± 0,1 ^{n,D}	8,7 ± 0,3 ^{q,D}
0,10	16,5 ± 0,3 ^{b,E}	15,1 ± 0,1 ^{g,F}	8,2 ± 0,5 ^{j,G}	10,0 ± 0,6 ^{m,H}	9,7 ± 0,7 ^{q,H}
0,20	16,1 ± 0,8 ^{b,I}	12,5 ± 1,2 ^{f,J}	9,4 ± 0,8 ^{j,K}	7,6 ± 0,4 ^{n,K}	8,7 ± 0,8 ^{q,K}
0,60	37,0 ± 0,4 ^{c,L}	23,4 ± 0,1 ^{h,M}	11,0 ± 0,1 ^{k,N}	8,2 ± 0,1 ^{o,O}	16,8 ± 0,4 ^{r,P}
1,10	39,5 ± 0,8 ^{d,Q}	23,7 ± 0,8 ^{h,R}	14,0 ± 0,5 ^{l,S}	15,0 ± 0,3 ^{p,S}	14,2 ± 0,3 ^{s,S}
2,00	42,3 ± 0,2 ^{e,T}	14,2 ± 0,6 ^{f,U}	11,0 ± 0,5 ^{k,V}	10,0 ± 0,8 ^{m,V}	10,8 ± 0,8 ^{t,V}

Resultados com letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa. Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança para membranas preparadas com a mesma concentração inicial de prata.

4.6. Estabilidade das membranas em fluidos

As membranas contendo ou não AlphaSan[®] tiveram suas perdas de massa avaliadas em cinco diferentes fluidos: água, solução salina, solução tampão PBS, fluido corpóreo simulado e soro fetal bovino. Os dados referentes à perda de massa para os referidos materiais são mostrados na Tabela 4.4.

De acordo com Wang *et al.*(2001) a mistura das soluções de quitosana e alginato leva à formação de uma suspensão composta por fibras finas de quitosana-alginato, juntamente com moléculas de quitosana e de alginato que não reagiram. Segundo Yan *et al.*(2000), o complexo polieletrólito de quitosana e alginato é insolúvel em água e, portanto, a perda de massa pode ser atribuída principalmente ao alginato que não interagiu com a quitosana, visto que a quitosana é pouco solúvel em soluções aquosas não acidificadas. Dessa maneira, Yu *et al.*(2005) sugerem a reticulação iônica com íons Ca^{+2} para um aumento da estabilidade do complexo polieletrólito. Entretanto, também afirmam que embora a reticulação iônica melhore as propriedades de perda de massa dos polieletrólitos de quitosana e alginato, prejudica as taxas de liberação da prata.

Tabela 4.4: Dados de perda de massa em fluidos diversos para membranas contendo concentrações variadas de prata.

Conc. prata (%)	Perda de Massa (%)				
	Água	SS	PBS	FCS	SFB
0,00	10,9 ± 0,3 ^{abd}	7,2 ± 0,5 ^{fghj}	6,0 ± 0,3 ^{l,A}	5,8 ± 0,3 ^{rs,A}	2,9 ± 0,2 ^x
0,05	8,0 ± 0,2 ^{ab}	7,5 ± 0,9 ^{fghj,B}	9,2 ± 0,4 ^m	7,1 ± 0,2 ^{rsu,B}	6,9 ± 0,5 ^{yz,B}
0,10	27,5 ± 4,0 ^{ce}	8,0 ± 0,1 ^{fji}	9,7 ± 0,3 ^{mn,C}	7,07 ± 0,1 ^{rsu,C}	6,2 ± 0,2 ^{yz}
0,20	9,6 ± 0,5 ^{abd}	5,8 ± 0,2 ^{fhi,j,D}	8,9 ± 0,1 ⁿ	5,15 ± 0,6 ^{t,D}	1,0 ± 0,1 ^{xz}
0,60	16,4 ± 1,2 ^{ade}	5,1 ± 0,7 ^{ghij,E}	5,0 ± 0,1 ^{lo,E}	8,68 ± 0,7 ^{su,v}	0,8 ± 0,1 ^{xy}
1,10	20,0 ± 1,5 ^{cde}	6,5 ± 0,1 ^{fghj,F}	6,3 ± 0,1 ^{o,F}	9,57 ± 0,8 ^{su,v}	0,4 ± 0,1 ^{xyz}
2,00	27,5 ± 1,4 ^{ce}	7,2 ± 0,1 ^{fghj,G}	7,3 ± 0,1 ^G	10,64 ± 0,5 ^{uv}	0,4 ± 0,1 ^{xyz}

Resultados com letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa. Resultados com letras maiúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma concentração de prata.

Ainda nesse sentido, Li *et al.* (2005) sugerem que quanto maior a interação entre os grupos amino da quitosana e as carboxilas do alginato, menor será a disponibilidade dos grupos carboxílico livres do alginato, e consequentemente maior será a estabilidade do complexo.

Desta forma, grande parte da perda de massa das membranas utilizadas neste trabalho pode ser atribuída ao alginato não reticulado e a uma provavelmente pequena proporção de perda do AlphaSan[®], já que as partículas de prata podem ser são trocadas com íons sódio presentes em algumas das soluções testadas e no exsudato.

As porcentagens mais altas de perda de massa foram verificadas nas membranas imersas em água. Para membranas preparadas na presença do agente antimicrobiano em contato com a água, esse valor variou de 8,0 a 27,5% e para membranas isentas de agente antimicrobiano, foi de 10,9%. Bueno (2010) obteve em seu trabalho 6,8% de perda de massa em água para membranas de quitosana e alginato, e Rodrigues (2008) obteve valores entre 9,0 a 21,0% para membranas de quitosana e alginato quando produzidas em diferentes taxas de agitação. Dessa forma, a diferença entre os valores obtidos em relação aos da literatura podem ser atribuídos às condições de preparação das membranas (taxa de agitação, vazão de adição da quitosana, etc.), às condições utilizadas nos testes de perda de massa (volume de solução, tempo e temperatura) e do tipo de quitosana utilizado (origem, lote, grau de desacetilação, etc.).

Quanto à exposição aos demais fluidos, as diferenças nos valores obtidos nos ensaios de perda de massa podem ser atribuídas à variação dos valores de pH destas soluções, uma vez que o pH do NaCl favorece a interação da quitosana e alginato, enquanto que o pH do FCS e do PBS favorecem a desprotonação da quitosana, dificultando a manutenção da interação dos polieletrólitos e enfraquecendo a estrutura da membrana, que seria mais facilmente solubilizada. Hugerth *et al.* (1997) estudaram um complexo formado por iota-carragena e quitosana e afirmam que o aumento da concentração salina de 30mM para 100mM de NaCl e KCl leva um aumento no caráter hidrofóbico das cadeias devido à blindagem das cargas dos polissacarídeos, diminuindo a solubilidade do polieletrólito e, consequentemente, a perda de massa em solução, como foi observado para membranas preparadas na ausência de prata.

As porcentagens mais baixas para perda de massa foram obtidas em soro fetal bovino (0,40% a 6,85%). Qin (2005) afirma que a prata e as proteínas do soro possuem alta afinidade de ligação. Dessa maneira, pode-se supor que as proteínas do soro fetal bovino formam quelatos com as partículas de prata do AlphaSan[®] nas membranas, resultando em baixos valores de perda de massa. Pode também haver interação dos polissacarídeos com as proteínas, contribuindo para reduzir as perdas de massa, de forma que estes efeitos provavelmente prevalecem em comparação ao rompimento das interações quitosana e alginato.

Nota-se, assim, que como a perda de massa das amostras contendo AlphaSan é relativamente baixa, possivelmente as membranas poderiam ser utilizadas como curativos em lesões úmidas por alguns dias antes que sua troca fosse necessária.

4.7. Comportamento quanto à capacidade de drenagem de água

A taxa de drenagem de água é um importante fator a ser considerado no desenvolvimento de curativos, pois estes devem ser capazes de impedir o acúmulo de exsudatos e a desidratação excessiva da lesão. Na Tabela 4.5 são apresentados os valores médios de capacidade de drenagem de água das membranas preparadas na presença de diversas concentrações de AlphaSan[®].

Tabela 4.5: Capacidade de drenagem de água pelas membranas.

Concentração de prata (%)	Capacidade de drenagem (g/m ² .dia)
0,00	12.109 ± 512 ^a
0,05	7.198 ± 129 ^b
0,10	5.349 ± 315 ^c
0,20	5.176 ± 214 ^c
0,60	4.916 ± 319 ^c
1,10	4.537 ± 347 ^c
2,00	4.458 ± 175 ^c

Resultados com letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

A taxa encontrada nesse estudo para membranas de quitosana e alginato sem o AlphaSan[®] foi de 12.109,15 g/m²dia, o que está de acordo com a literatura. Rodrigues (2008) obteve taxas de drenagem entre 12.219 a 14.343 g/(m²dia) para membranas constituídas de quitosana e alginato sem incorporação de fármaco.

Foi observado que a capacidade de drenagem das membranas de quitosana e alginato incorporando AlphaSan[®] reduziu conforme a adição do composto na mistura inicial. Isso se deve, possivelmente, ao aumento da espessura das membranas devido à presença das partículas do agente antimicrobiano localizadas entre as fibras de quitosana e alginato, dificultando a permeação da água.

De acordo com Behar *et al.* (1985) a pele saudável perde água em média, cerca de 240 g/(m²dia). Lamke *et al.* (1977) relatam que a perda de água para a pele lesada pode variar de 279 ± 26 g/(m²dia) para queimaduras de primeiro grau a 5.138 ± 202 g/(m²dia) para feridas granulares. Balakrishnan *et al.* (2005) afirmam que curativos com taxas de drenagem de 2.000 a 2.500 g/(m²dia) promoveriam um nível adequado de umidade para feridas, sem permitir que ocorresse desidratação excessiva. Por outro lado, Behar *et al.* (1985) consideram os valores de permeabilidade à água próximo a 5.000 g/(m²dia) como ideais para curativos utilizados em feridas com alto grau de exsudato. Ou seja, não há consenso quanto a este aspecto.

Dessa forma, os resultados de capacidade de drenagem de água obtidos indicam que as membranas produzidas de quitosana e alginato, se preparadas na presença de 0,05% de prata (ou 0,5% de AlphaSan[®]) poderiam ser utilizadas em feridas com alto grau de exsudato, enquanto que as obtidas empregando de 0,2% a 2,0% de prata (ou 2 a 20% de AlphaSan[®]) seriam recomendadas para feridas com moderados níveis de exsudato.

4.8. Avaliação da resistência mecânica das membranas

Na Tabela 4.6 estão apresentados os valores obtidos por meio dos ensaios de resistência mecânica das membranas de quitosana e alginato com e sem o agente antimicrobiano.

Os valores encontrados de resistência à tração para membranas com o agente antimicrobiano foram inferiores aos observados para as isentas de AlphaSan[®]. Bueno (2010) obteve para membranas de quitosana e alginato valores de 10,9 MPa de resistência a tração e 2,8% de alongamento na ruptura, valores próximos aos encontrados neste trabalho. Por outro lado, Rodrigues (2008) obteve valores de resistência a tração de 27,7 MPa e 8,42% de alongamento na ruptura, para membranas de quitosana e alginato isentas de bacitracina, enquanto que para membranas incorporando bacitracina foram encontrados valores de 17,3 MPa e 4,3%. Esse comportamento foi atribuído à maior facilidade da estrutura polimérica de se romper nos locais onde o fármaco estava acomodado. O mesmo pode se supor com relação às amostras contendo AlphaSan[®]. Bueno (2010) reticulou membranas de quitosana e alginato com CaCl₂ e (NH₄)₂SO₄, e obteve valores de resistência à tração de 19,43 MPa e alongamento na ruptura de 3,17%. Por outro lado, Meng *et al.* (2010) obtiveram valores de 36 a 52 MPa e 5,3 a 8,4% para membranas no estado seco de quitosana e alginato incorporando sulfadiazina de prata.

Tabela 4.6: Propriedades mecânicas das membranas de quitosana e alginato preparadas na presença ou ausência de prata.

Conc. prata (%)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
0,00	9,79 ± 1,51 ^a	3,25 ± 1,43 ^c
0,05	9,09 ± 0,63 ^a	2,42 ± 0,73 ^c
0,10	5,90 ± 1,53 ^b	3,61 ± 1,06 ^c
0,20	5,35 ± 1,99 ^b	4,46 ± 0,76 ^c
0,60	4,98 ± 1,92 ^b	3,54 ± 1,26 ^c
1,10	3,91 ± 2,78 ^b	3,09 ± 1,39 ^c
2,00	2,03 ± 2,83 ^b	3,54 ± 1,16 ^c

Resultados com letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

Dessa forma pode-se concluir que a concentração, composição polimérica, o tempo de reação entre os complexos e o estado físico do agente antimicrobiano são fatores que influenciam a resistência à tração e a flexibilidade das membranas. Destaca-se que há grande variabilidade nos ensaios de tração, com relação as condições experimentais, o que dificulta a comparação direta dos dados obtidos com os relatados na literatura. No entanto, nota-se que não há alterações, praticamente, na ordem de grandeza dos resultados, o que permite concluir que membranas de quitosana e alginato têm razoável fragilidade tanto se preparadas na presença quanto na ausência de agentes antimicrobianos.

4.9. Eficiência da incorporação da prata nas membranas

A eficiência de incorporação da prata nas membranas de quitosana e alginato com relação à quantidade inicialmente adicionada está apresentada na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Porcentagem de prata incorporada nas membranas de quitosana e alginato.

Concentração de prata inicialmente adicionada (%)	Concentração de prata incorporada (%)	Eficiência de incorporação (%)
0,05	0,040 ± 0,002 ^a	87,10 ± 4,15 ^g
0,10	0,090 ± 0,005 ^b	87,19 ± 5,18 ^g
0,20	0,180 ± 0,001 ^c	91,42 ± 1,21 ^g
0,60	0,571 ± 0,002 ^d	94,93 ± 0,23 ^h
1,10	0,990 ± 0,001 ^e	98,52 ± 2,19 ^h
2,00	1,980 ± 0,004 ^f	99,33 ± 0,19 ^h

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

Por meio dos valores obtidos é possível afirmar que grande parte do fármaco adicionado ao sistema foi incorporada com êxito. Isso indica que o processo de inclusão do fármaco no complexo polimérico antes da secagem foi adequado. Rodrigues (2008) obteve no processo de incorporação por imersão em solução de bacitracina das membranas de quitosana e alginato

valores muito inferiores, entre 11 e 25,5%, o que pode ser atribuído à maior solubilidade deste composto em soluções aquosas que do AlphaSan[®].

Verifica-se uma tendência de aumento da incorporação com a elevação da concentração de AlphaSan[®] adicionada, possivelmente porque este composto é pouco solúvel em soluções aquosas, tendendo a formar aglomerados em altas concentrações. Tais aglomerados ficam mais eficientemente retidos na estrutura polissacarídica do PEC formado, notando-se perdas de material de até 13% em condições de baixa concentração inicial de AlphaSan[®]. Esta perda pode ocorrer em diferentes etapas do processo, a saber, durante a reticulação secundária em solução de CaCl₂ ou durante as lavagens. Os resultados de sua avaliação estão indicados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Perda mássica de prata após cada etapa do processo de lavagem das membranas.

Concentração de prata inicialmente adicionada (%)	Perda por etapa do processo (%)		
	Reticulação com solução de CaCl ₂	1ª lavagem com água	2ª lavagem com água
0,05	5,93 ± 0,05 ^a	3,15 ± 0,01 ^g	3,81 ± 0,09 ^m
0,10	6,66 ± 0,02 ^b	4,10 ± 0,07 ^h	2,09 ± 0,10 ⁿ
0,20	6,51 ± 0,01 ^c	1,91 ± 0,02 ⁱ	1,64 ± 0,02 ^o
0,60	2,87 ± 0,04 ^d	1,69 ± 0,03 ^j	0,51 ± 0,06 ^p
1,10	1,09 ± 0,01 ^e	0,24 ± 0,01 ^k	1,48 ± 0,03 ^q
2,00	0,50 ± 0,03 ^f	0,10 ± 0,01 ^l	0,07 ± 0,01 ^r

Resultados com letras iguais indicam que os ensaios não diferiram estatisticamente entre si a 95% de confiança.

A maior perda de massa acontece após a etapa de reticulação com solução de cloreto de cálcio, possivelmente, em função de troca iônica, propiciando uma perda mássica mais elevada do que durante as lavagens com água deionizada.

Ainda assim, as perdas de prata encontradas por etapa foram bastante reduzidas, uma vez que altas eficiências de incorporação podem ser atribuídas às baixas taxas de liberação de droga no meio e que, neste caso, o limite de solubilidade do fármaco está abaixo da concentração do

mesmo na matriz e, então, de acordo com Raval *et al.*(2010) o processo de liberação é possivelmente controlado pela dissolução do fármaco.

4.10. Cinética de liberação da prata incorporada nas membranas

Os perfis de liberação de prata das membranas de quitosana e alginato em PBS estão apresentados na Figura 4.9. Foram analisados os perfis para as membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 0 a 2% de prata em solução tampão PBS, por ser este o tampão mais comumente empregado neste tipo de ensaio.

Foi constatado que os perfis de liberação não tiveram alterações significativas quando o fluido de liberação foi trocado integralmente ou parcialmente.

De acordo com Caraballo (2009), a cinética de liberação do fármaco é condicionada por fatores como: o transporte de fluido corpóreo para a matriz polimérica, o intumescimento do polímero com a formação de uma camada de gel, a difusão do fármaco através da camada do polímero intumescido e a erosão do polímero intumescido.

Grassi e Grassi (2005) afirmam que a distribuição do fármaco na matriz é um fator de grande influência na cinética de liberação e que diante disso, diferentes comportamentos podem ser verificados, fato que foi observado nesse trabalho. Destaca-se que foi possível observar por meio da Figura 4.3, que as membranas apresentaram distribuição heterogênea do composto ao longo de sua espessura e que todas as membranas contendo prata apresentaram aglomeração de partículas.

Comparando-se as cinéticas de liberação, observa-se uma redução nas taxas de liberação conforme aumenta a concentração de prata incorporada. Para as membranas preparadas na presença de 0,05% a 0,20% de prata foram obtidas taxas próximas de 100%, enquanto que as preparadas com 0,60% a 2% de prata, esses valores atingiram em média 55%. Esse comportamento está de acordo com o descrito por Meng *et al.* (2010), que observaram que ao triplicar a concentração de sulfadiazina de prata em membranas de quitosana e alginato, a taxa de liberação foi reduzida pela metade. Uma hipótese para explicar esse comportamento é que a

difusão das partículas do fármaco foi facilitada à medida que a concentração de prata diminuía, uma vez que o fluxo difusivo está diretamente relacionado com a concentração. Nas amostras com maiores concentrações iniciais tem-se uma etapa adicional de desagregação dos aglomerados que antecede a difusão da prata.

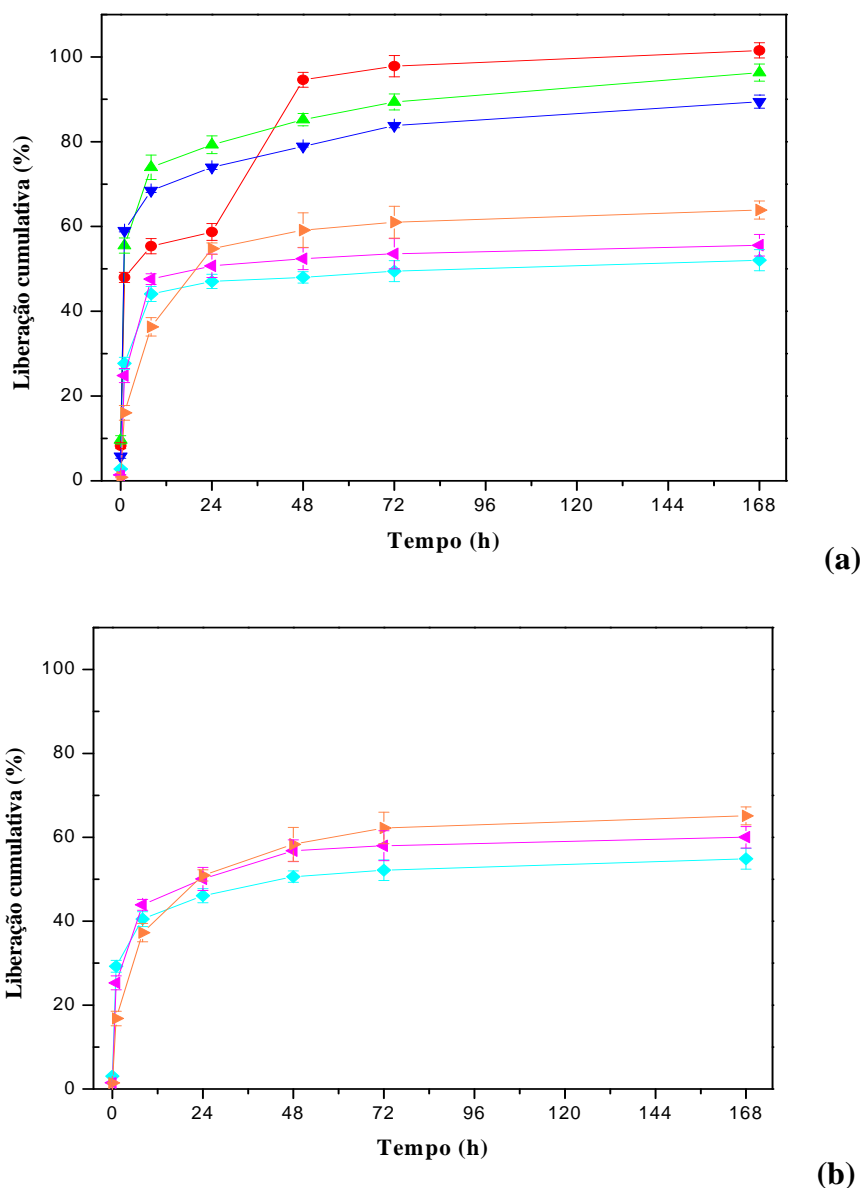


Figura 4.9 – Perfil de liberação da prata nas membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata em solução tampão PBS: (a) com retirada e substituição total do meio (b) com retirada e substituição de apenas 7% do meio.

Por outro lado, as membranas preparadas na presença de 2% de prata apresentaram uma liberação superior às que continham 0,6% e 1,1% de prata, fato que não corrobora com a hipótese proposta da etapa inicial de desagregação dos aglomerados. Isso pode ser atribuído à estruturação da membrana, uma vez que as membranas contendo 2% de prata apresentaram um maior número de lamelas, o que, provavelmente, ocasionou um processo erosivo maior.

Outro fator a ser considerado no perfil de liberação é a espessura da matriz polimérica. Espessuras menores indicam uma menor barreira para que o PBS penetre em toda a membrana; diante disto há um aumento das interações fluido-polímero em intervalos de tempo menores e então, o relaxamento das cadeias poliméricas é facilitado, promovendo a difusão do fármaco. Os resultados obtidos nos ensaios de medida de espessura, perda de massa e absorção de solução PBS corroboram essa hipótese, uma vez que membranas com baixas concentrações de prata são mais finas, apresentam menor estabilidade após 168h em solução de PBS e atingem a capacidade máxima de intumescimento em menores intervalos de tempo.

Outro aspecto importante a ressaltar é a reticulação iônica, que também possui influência na cinética de liberação da prata. No trabalho de Yu *et al.* (2005) foram obtidos valores próximos de 90% para esponjas de quitosana e alginato contendo sulfadiazina de prata e 60% de liberação quando estas foram reticuladas ionicamente com Ca^{2+} . A reticulação dificulta a liberação da prata, pois diminui a hidrofilicidade do PEC. Além disso, o processo de reticulação aumenta drasticamente a massa molar do complexo polimérico, o que reduz ainda mais a sua solubilidade em água e retarda o processo de hidratação e, conseqüentemente, diminui a taxa de liberação do fármaco (Aiedeh *et al.*, 2007).

Neste trabalho, embora tenham sido utilizadas as mesmas condições de reticulação iônica (concentração, pH e tipo de agente reticulante) para todos os tipos de membranas, não é possível afirmar que o processo tenha ocorrido de forma idêntica em todos os casos, uma vez que a concentração de íons prata pode ter influenciado no balanço de cargas e na interação dos íons Ca^{2+} com os resíduos carboxílicos ($-\text{COO}^-$) livres do alginato.

Os perfis de eluição de prata das membranas de quitosana e alginato em PBS estão apresentados na Figura 4.10.

Observa-se que com o aumento da concentração da prata na membrana, houve um aumento na concentração da prata liberada. Freeman *et al.*(2007) obtiveram valores próximos de 50 ppm de prata para um curativo de alginato e carboximetilcelulose contendo carbonato de prata, enquanto que curativos comercialmente disponíveis como o Aquacel Ag e Silver Alginate II apresentam valores de 70 ppm e 55 ppm, respectivamente (relatório técnico fornecido pela LM Farma). A concentração máxima alcançada nesse trabalho foi próxima das descritas na literatura, sendo obtido um valor de 60 ppm para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 2% de prata.

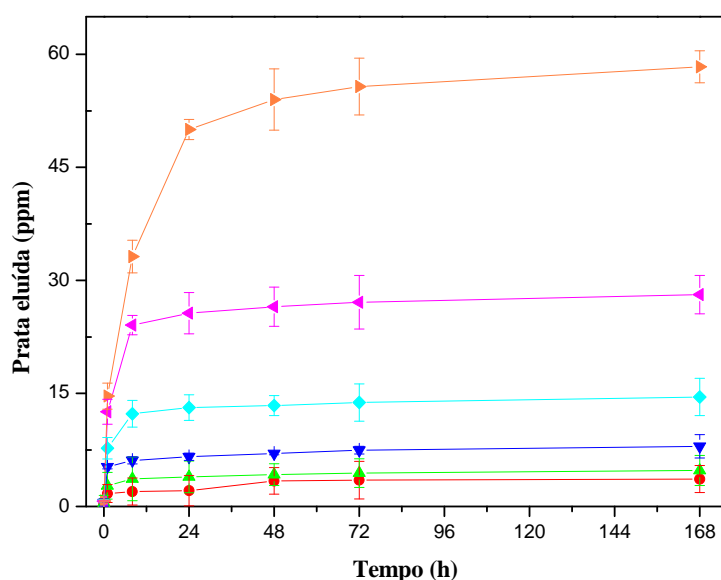


Figura 4.10 – Perfil de eluição da prata nas membranas de quitosana e alginato alginato preparadas na presença de (●) 0,05%, (▲) 0,10%, (▼) 0,20%, (◆) 0,60%, (◀) 1,10% e (▶) 2,00% de prata.

4.11. Análise dos mecanismos de liberação da prata da matriz polimérica de quitosana e alginato

O ajuste dos dados experimentais aos diferentes modelos matemáticos testados é representado graficamente nas Figuras 4.11 a 4.13 para as amostras preparadas na presença de 0,6 a 2% de prata e expostas a PBS. Somente foram avaliados os resultados para estas formulações

porque as restantes apresentaram baixas concentrações de prata eluída, sendo portanto, de menor atratividade comercial.

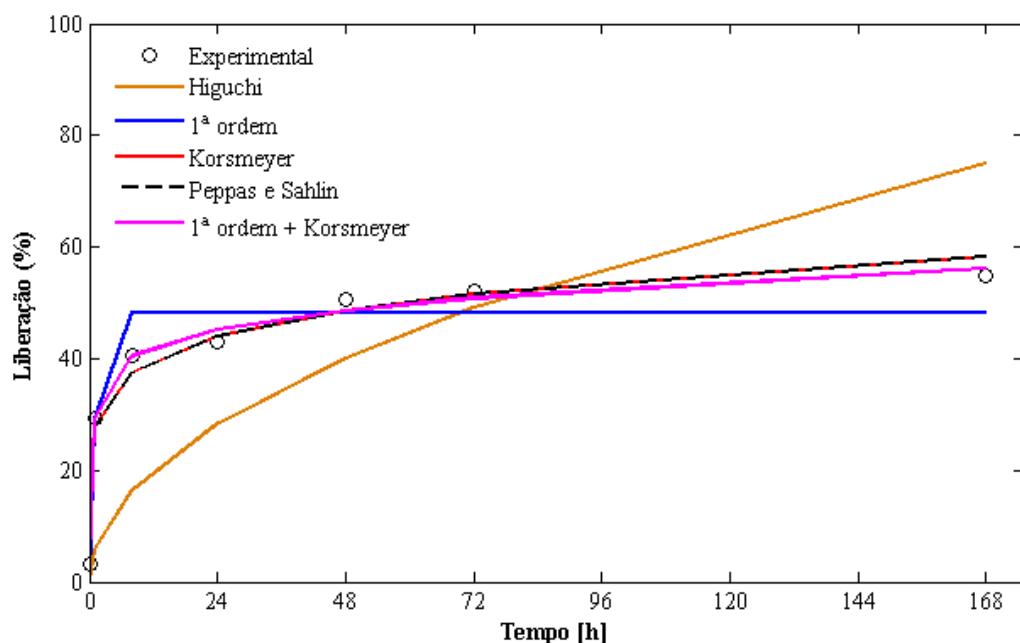


Figura 4.11 – Ajuste gráfico dos dados de liberação em PBS para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 0,6% de prata.

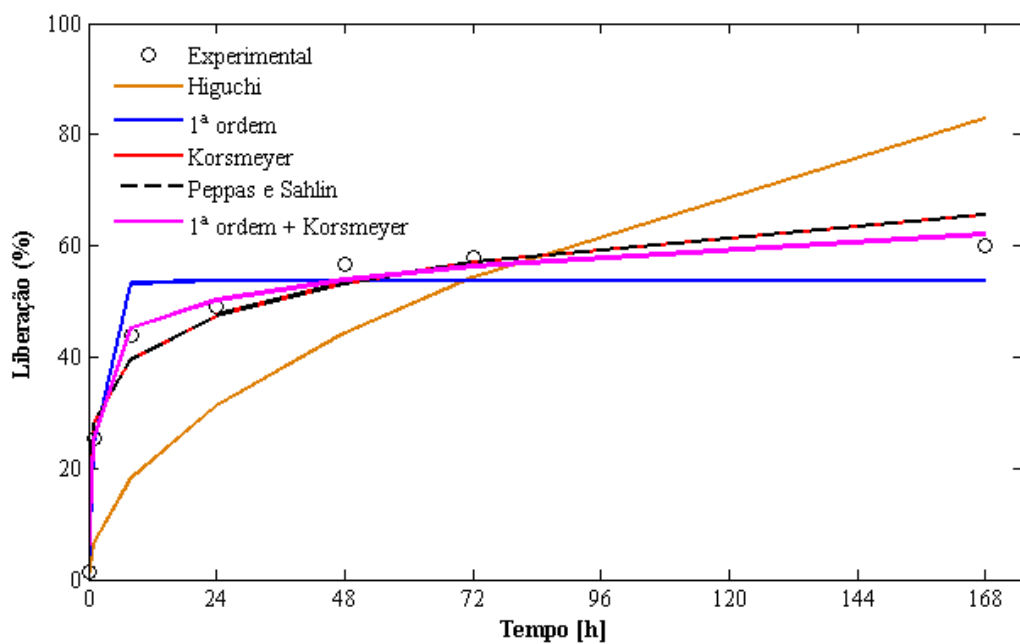


Figura 4.12 – Ajuste gráfico dos dados de liberação em PBS para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% de prata.

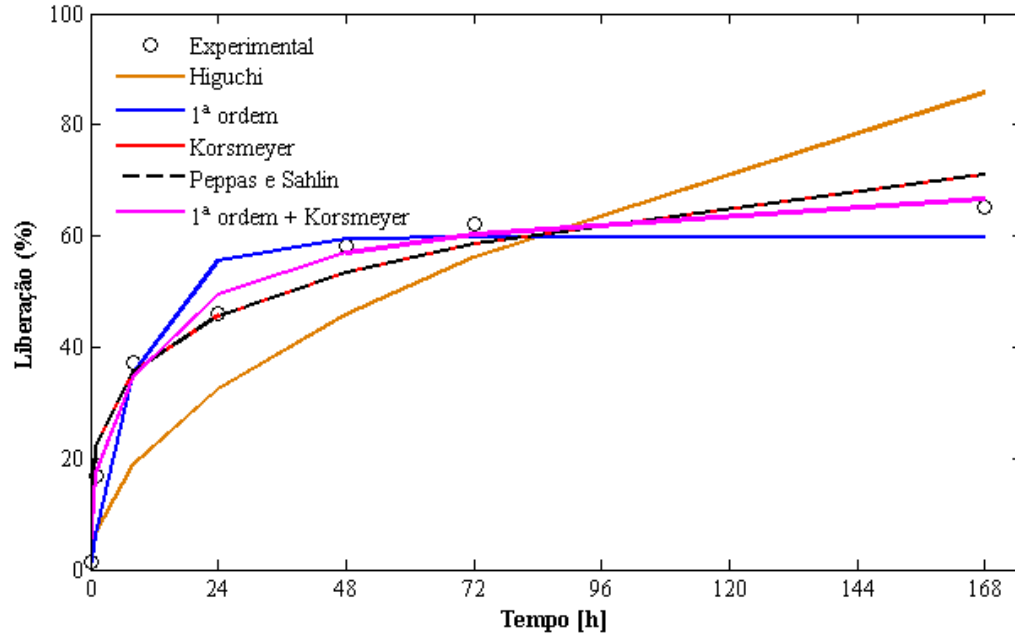


Figura 4.13 – Ajuste gráfico dos dados de liberação em PBS para membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 2,0% de prata.

Os valores para a constante de liberação segundo o modelo de Higuchi (Equação 8) estão apresentados na Tabela 4.9.

$$Q = K_h \cdot \sqrt{t} \quad (\text{Equação 8})$$

Foi considerado que a liberação de prata das membranas de quitosana e alginato acontecia em duas faces da membrana, uma vez que ela estava totalmente imersa no fluido PBS. Então, para este ajuste foi considerado uma nova constante K_j , que equivale ao dobro de K_h . Assim, a Equação 8 fica:

$$Q = K_j \cdot \sqrt{t} \quad (\text{Equação 26})$$

Tabela 4.9: Parâmetros da equação de Higuchi (1961) para os dados de liberação *in vitro* da prata em meio tampão PBS a partir de diferentes formulações de membrana.

Concentração de prata (%)	K_h	R^2_{ajustado}
0,60	2,89	0,04
1,10	3,20	0,27
2,00	3,31	0,64

Por meio dos valores de R^2 é possível afirmar que os dados experimentais não se ajustaram ao modelo proposto. O uso desse modelo em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente para a predição do comportamento, pois sistemas deste tipo podem ser erodíveis, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco (Lopes *et al.*, 2005). Dessa maneira, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada. Assim, este modelo é mais aplicável a matrizes pouco solúveis e/ou que não apresentem capacidade de intumescimento, o que não é o caso das membranas obtidas. Diante disso, o modelo de primeira ordem (Equação 15) foi empregado. Os valores dos parâmetros obtidos encontram-se na Tabela 4.10.

$$Q = VC_s(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 15})$$

Tabela 4.10: Parâmetros da equação de primeira ordem para os dados de liberação *in vitro* da prata em meio tampão PBS.

Concentração de prata (%)	C_s (mg/mL)	k	R^2_{ajustado}
0,60	62,9	48,27	0,91
1,10	64,0	53,77	0,93
2,00	65,2	59,78	0,93

Embora os valores de coeficiente de correlação nesta situação tenham sido maiores que os obtidos pelo uso do modelo proposto por Higuchi (1961), o modelo de primeira ordem é ainda inadequado para representar a cinética de liberação da prata da matriz de quitosana e alginato. De acordo com Balcerzak e Mucha (2010), esse modelo não descreve a dissolução do agente

ativo que está efetivamente preso entre os polímeros. O modelo de primeira ordem representa o comportamento do composto que se encontra somente na superfície da matriz, e consequentemente, descreve somente o processo de liberação instantânea por dissolução do mesmo.

Diante disso, o modelo semi-empírico da Korsmeyer *et al.*(1983) foi aplicado (Equação 19). Este modelo relaciona exponencialmente a liberação de uma substância com o tempo. Na Tabela 4.11 estão apresentados os valores dos parâmetros obtidos.

$$Q = K_2 \cdot t^n \quad (\text{Equação 19})$$

Tabela 4.11: Parâmetros da equação de Korsmeyer *et al.*(1983) para os dados de liberação *in vitro* da prata em meio tampão PBS.

Concentração de prata (%)	K ₂	n	R ² _{ajustado}
0,6	27,81	0,14	0,97
1,1	28,07	0,17	0,96
2,0	22,22	0,22	0,97

Os valores encontrados para o parâmetro *n* ficaram entre 0,14 e 0,22 o que, de acordo com Korsmeyer *et al.*(1983), indica que o mecanismo de liberação se deve primordialmente à difusão.

Analisando-se o parâmetro *K₂*, nota-se que valores distintos foram obtidos para a constante cinética da liberação conforme houve a variação das concentrações iniciais de AlphaSan[®] nas membranas. Isso ocorre porque que essa constante incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo de liberação, o que está diretamente relacionado com a variação da concentração e da distribuição do fármaco na matriz.

Na tentativa de verificar as contribuições relativas dos dois fenômenos responsáveis pela liberação (difusão e relaxamento), o modelo de Peppas e Sahlin (1989) foi utilizado. Os

parâmetros da equação de Peppas e Sahlin (1989) (Equação 20) determinados encontram-se na Tabela 4.12.

$$Q = K_3 \cdot t^m + K_4 \cdot t^{2m} \quad (\text{Equação 20})$$

Com esses resultados, verifica-se baixa contribuição relativa aos fenômenos de erosão e relaxamento, fato indicado pelo valor da constantes K_4 , praticamente nulo. Como consequência disso, este modelo resultou em curva praticamente idêntica ao modelo proposto por Korsmeyer *et al.* (1983).

Tabela 4.12: Parâmetros da equação de Peppas e Sahlin (1989) para os dados de liberação *in vitro* da prata em meio tampão PBS.

Concentração de prata (%)	K_3	K_4	m	R^2_{ajustado}
0,60	27,81	$1,67 \cdot 10^{-7}$	0,14	0,97
1,10	28,07	$1,33 \cdot 10^{-8}$	0,16	0,96
2,00	22,22	$5,69 \cdot 10^{-7}$	0,22	0,97

O modelo de Peppas e Sahlin (1989) indica que o fenômeno principal que caracteriza a liberação da prata na matriz de quitosana e alginato é a difusão, ou seja, o transporte caso I. Grassi e Grassi (2005) propõem que a liberação da droga no transporte caso I acontece quando o solvente penetra na matriz distanciando as cadeias poliméricas e, ocasiona a dissolução e difusão do fármaco.

No caso das matrizes com AlphaSan[®], a etapa de desagregação dos aglomerados do composto ativo provavelmente ocorre quando as cadeias poliméricas se distanciam e somente em seguida há difusão e dissolução da prata.

Nesse sentido, foi proposta uma equação (Equação 27) que envolve os fenômenos de difusão e dissolução do agente ativo. Para isso os modelos de primeira ordem e o de Korsmeyer

et al.(1983) foram combinados em uma única equação e, os valores dos parâmetros obtidos são apresentados na Tabela 4.13.

$$Q = C_s (1 - e^{-k_1 t}) + K_s \cdot t^m \quad (\text{Equação 27})$$

Com base no ótimo ajuste dos dados a este modelo, conclui-se que este é o que descreve melhor o comportamento de liberação da prata na matriz de quitosana e alginato.

Tabela 4.13: Parâmetros do modelo combinado de primeira ordem e de Korsmeyer *et al.* (1983) para os dados de liberação *in vitro* da prata em meio tampão PBS.

Concentração de prata (%)	C _s (mg/mL)	k ₁	K _s	n	R ² _{ajustado}
0,60	21,52	1,45	14,36	0,18	0,99
1,10	24,73	0,68	12,18	0,20	0,99
2,00	26,94	0,08	15,45	0,19	0,99

4.12. Desempenho quanto à eficácia antimicrobiana

4.12.1. Halo de inibição

Por meio da Tabela 4.14, observa-se que as membranas constituídas somente de quitosana e alginato não apresentaram atividade antimicrobiana. Por outro lado, a membrana preparada na presença de 1,1% de prata apresentou eficácia antimicrobiana satisfatória contra as cepas testadas, com adequado potencial de uso na aplicação em feridas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* e principalmente, por *Staphylococcus aureus*.

Rodrigues (2008) obteve um halo de inibição para a bactéria *Staphylococcus aureus* entre 9 a 11 mm para as membranas de quitosana e alginato incorporando bacitracina, assegurando o potencial antimicrobiano somente para bactérias gram positivas, uma vez que se sabe que a bacitracina não apresenta atividade antimicrobiana para bactérias gram negativas. Por outro lado,

Yu *et al.* (2005) observaram em esponjas de quitosana e alginato contendo sulfadiazina de prata a formação de halos de inibição entre 6 e 16 mm para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os autores atribuem a inibição do crescimento dos microrganismos à sulfadiazina de prata incorporada e também à desestruturação do complexo de quitosana e alginato, que ao ser rompido durante a incubação, liberou quitosana livre, que por possuir cargas positivas, poderia se ligar com as cargas negativas dos componentes da parede celular das bactérias Gram negativas e Gram positivas e desestruturar a parede celular das mesmas. No entanto, como a membrana de quitosana e alginato sem o composto antimicrobiano não apresentou efeito inibitório, pode-se supor que a atividade antimicrobiana encontrada neste trabalho deve-se somente ao composto AlphaSan[®] RC2000.

Tabela 4.14: Atividade antimicrobiana das membranas com e sem prata.

Cepa	Membrana sem prata		Membrana preparada na presença de 1,1% de prata	
	Halo (mm)	Atividade antimicrobiana	Halo (mm)	Atividade antimicrobiana
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Não aceitável	4	Satisfatório
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	Não aceitável	6	Altamente satisfatório

4.13. Desempenho quanto à citotoxicidade *in vivo* a fibroblastos

Na Tabela 4.15 são apresentados os resultados da análise de citotoxicidade à fibroblastos de membranas (em quadruplicata) preparadas na presença de 1,1% de prata.

Tabela 4.15: Citotoxicidade das membranas com e sem prata a fibroblastos NCTC Clone 929.

Material	Índice de Zona			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Membrana preparadas na presença de 1,1% de prata	3	3	3	3
Controle negativo (papel filtro atóxico)	0	0	0	0
Controle positivo (látex tóxico)	4	4	4	4

Observa-se que as membranas preparadas na presença de 1,1% de prata apresentaram efeitos citotóxicos moderados, o que já era de certa forma, esperado. De acordo com Atiyeh *et al.* (2007), a prata apresenta efeitos tóxicos a queratinócitos e fibroblastos. Esse efeito também pode ser observado em outros curativos já comercializados como, por exemplo, o Aquacel® Ag da Convatec.

No entanto, pode-se ressaltar que os benefícios da utilização de curativos com prata superam a desvantagem de seu efeito citotóxico, pois a prata não apresenta efeitos colaterais sistêmicos e melhora de forma geral o processo de cicatrização. Além disso, são raros os casos de resistência bacteriana, visto que existem múltiplos sítios de ligação dos íons Ag^+ com as bactérias.

4.14. Desempenho quanto à irritação dérmica

No teste de irritação dérmica cada animal foi avaliado separadamente e os resultados das leituras obtidas estão apresentados na Tabela 4.16.

De acordo com os critérios de classificação do método adotado, as membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% prata foram consideradas não irritantes, com índice geral médio nulo. Além disso, os animais estudados não apresentaram alterações macroscópicas perceptíveis durante a realização do estudo.

Tabela 4.16: Graduação das reações dérmicas obtidas nos ensaios de irritabilidade dérmica.

Cobaia	Peso (g)		Grau de sensibilização								Média
	Inicial	Final	1 h		24 h		48 h		72 h		
			ED	ER	ED	ER	ED	ER	ED	ER	
1	3570	3580	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3140	3150	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3670	3680	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4.15. Desempenho quanto à sensibilidade dérmica

No testes de sensibilidade dérmica, os animais foram avaliados separadamente e os resultados obtidos estão indicados na Tabela 4.17. A ocorrência de edema ou eritema, mesmo em um único animal, indica que o mesmo é sensibilizante.

Tabela 4.17: Graduação das reações dérmicas obtidas nos ensaios de sensibilidade dérmica.

Amostra	Cobaia	Peso (g)		Grau de sensibilização							
		Inicial	Final	1 h		6 h		24 h		48 h	
				ED	ER	ED	ER	ED	ER	ED	ER
Grupo teste	1	350	500	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	360	510	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	350	500	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	340	490	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	320	470	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	310	460	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	300	450	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	340	490	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	320	470	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	330	480	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo Controle I	11	330	480	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	340	490	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	350	500	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	320	470	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	310	460	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo Controle II	16	310	460	0	0	0	0	0	0	0	0
	17	310	460	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	300	450	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	320	470	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	360	510	0	0	0	0	0	0	0	0

Grupo teste: membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% de prata foram aplicadas em dez animais na fase de indução e de desafio.

Grupo controle I: 0,5 mL de solução de 0,9% de cloreto de sódio foi aplicada na fase de indução em cinco animais e as membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% de prata foram aplicadas na fase de desafio em cinco animais.

Grupo controle II: membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% de prata foram aplicadas na fase de indução em cinco animais e 0,5 mL de solução de 0,9% de cloreto de sódio foi aplicada na fase de desafio em cinco animais.

Não se verificou formação de edema ou eritema em nenhum dos animais. Não foram observadas alterações no comportamento, consumo de ração e água pelos animais durante a avaliação. Os animais estudados não apresentaram alterações macroscópicas durante a realização do estudo. Diante disso, as membranas de quitosana e alginato preparadas na presença de 1,1% de prata foram classificadas como não sensibilizantes, fato que reforça sua segurança como curativo.

4.16. Substituição dos polímeros de grau analítico por material de grau farmacêutico

Na Tabela 4.18 estão apresentadas as observações feitas em três diferentes etapas do processo de produção das membranas, visando transpor a metodologia desenvolvida com reagentes comumente usados em pesquisa (e, portanto de baixa disponibilidade e alto custo) para materiais mais compatíveis com o uso em escala industrial. Destaca-se que apenas as formulações 1 e 5 resultaram em membranas adequadas.

A solução de alginato Kel Set apresentou maior viscosidade e turbidez que a do alginato da Sigma-Aldrich, fato que pode indicar maior massa molar do alginato Kel Set ou a presença de íons reticuladores multivalentes como o cálcio nesta matéria-prima. De acordo com a FMC Biopolymer (2008), o alginato Kel Set contém cálcio e sódio. Dessa forma, os grupos carboxílicos do alginato não estão totalmente livres para se reticularem com os grupos amino da quitosana, o que explica a formação inadequada das membranas dos tipos 2 e 3.

Já a quitosana da Chitopharm consiste de uma preparação de quitosana de cadeias curtas. Dessa maneira, a não formação das membranas de quitosana Chitopharm e do alginato Kel Set pode ser atribuída à massa molecular dos polímeros. Yan *et al.*(2000) afirmam que em polímeros de massa molecular muito alta prevalecem cadeias emaranhadas, o que compromete a acessibilidade dos grupos reativos. Por essa razão, a interação entre as cadeias da quitosana com o alginato dependerá da conformação da estrutura molecular dos polímeros, o que faz com que os grupos amino e carboxílicos estejam mais próximos ou não entre si. Diante disso, pode ter ocorrido a formação de agregados de pequeno tamanho que resultam em uma membrana pouco estável, devido ao pouco entrelaçamento e interpenetração molecular.

Tabela 4.18 – Caracterização das etapas do processo da produção de membranas utilizando alginatos e quitosanas de empresas distintas.

Formulação	Características dos aglomerados formados	Estrutura e aspecto da membrana	Aspecto durante e após o processo de Lavagem
Tipo 1 (0,5% alginato e 0,5% quitosana Sigma-Aldrich)	Heterogêneo e viscoso (aspecto de um gel denso)	Estruturada, coesa e com distribuição homogênea dos agregados	Normal
Tipo 2 (0,5% alginato Kel Set e 0,5% quitosana Sigma-Aldrich)	Heterogêneo e bifásico: fase líquida e gel	Sem estrutura contínua e com coloração amarelada	Fibras espessas e mal distribuídas
Tipo 3 (0,5% alginato Kel Set e 0,5% quitosana Cognis)	Heterogêneo e bifásico	Não houve formação	-
Tipo 4 (0,25% alginato Kel Set e 0,5% quitosana Cognis)	Homogêneo e pouco viscoso	Quebradiça e heterogênea: apresentou fibras mal distribuídas	Partes da membrana se dissolveram na solução de CaCl_2 . Não foi possível realizar a secagem do material
Tipo 5 (0,5% alginato Sigma-Aldrich e 0,5% quitosana Cognis)	Homogêneo e pouco viscoso	Estruturada e homogênea	Normal

Outro fator de importância para a complexação dos polímeros e consequentemente, para a formação da membrana, é o grau de desacetilação. Krayukhina *et al.*(2008) sugerem que quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, melhor será a estabilidade do complexo formado, apontando que para graus de desacetilação maiores que 80%, há a predominância da repulsão eletrostática entre os grupos amino protonados, resultando em cadeias entrelaçadas, o que facilita a interação com os grupos carboxila do alginato. Para graus de desacetilação entre 50% e 80%, os resíduos acetil participam de interações intramoleculares (por meio da formação de pontes de hidrogênio), e isso limita ainda mais a rotação das unidades piranose da quitosana em torno das

ligações glicosídicas. Em adição, o grupo acetamida (que apresenta um volume maior que a função amino) é responsável pelo impedimento estérico, o que limita a flexibilidade da cadeia. Com a diminuição do grau de desacetilação, esses efeitos tornam-se ainda mais importantes, aumentando as interações hidrofóbicas, contribuindo para a auto-agregação das moléculas de quitosana em solução e dificultando a formação de complexos.

Por outro lado, a combinação da quitosana Chitopharm com o alginato de sódio de grau analítico resultou em membranas próximas às obtidas com os polímeros de grau analítico. Diante disso, é possível concluir que o uso do alginato Kel Set não possibilita a formação de membranas, sugerindo-se testar outros tipos de alginatos de sódio de grau farmacêutico para a confecção das membranas.

5. CONCLUSÕES

O AlphaSan[®] RC2000 mostrou-se como uma potencial alternativa de agente antimicrobiano para uso em membranas de quitosana e alginato, sendo que não foi observada desestruturação do complexo polimérico após a adição do composto.

A eficiência de incorporação do agente antimicrobiano variou de 87 a 99%, o que indica que a perda de fármaco durante o processo foi pequena.

Com o aumento da concentração de fármaco nas membranas de quitosana e alginato, foi observado que as membranas tornam-se mais opacas e espessas. As membranas com AlphaSan[®] foram capazes de absorver até 42,31 g H₂O/g membrana, 23,43 g solução salina/g membrana, 15,04 g fluido corpóreo simulado/g membrana e 16,85 g soro fetal bovino/g membrana. A maior perda de massa em água foi de 27,53%, em solução salina de 8,01%, em fluido corpóreo simulado de 10,64% e em soro fetal bovino de 0,40%. A capacidade de drenagem de água sofreu redução conforme se aumentou a concentração do composto antimicrobiano e foram obtidos valores na faixa de 4.458 a 7.198g/m²dia. Os valores encontrados de resistência à tração para membranas com o agente antimicrobiano foram inferiores às isentas do AlphaSan[®] e variaram de 2 a 9 MPa.

Foi constatada moderada citotoxicidade a fibroblastos das membranas de quitosana e alginato contendo prata, supondo-se, entretanto, que os benefícios da utilização de curativos com prata superem a desvantagem de seu efeito citotóxico.

As membranas de quitosana e alginato sem o agente antimicrobiano não apresentaram efeito bactericida, ao contrário das que foram preparadas na presença de 1,1% de prata que apresentaram eficácia contra bactérias gram negativas e gram positivas, indicando preservação do potencial microbicida do AlphaSan[®].

As membranas contendo AlphaSan[®] foram capazes de liberar até 100% do fármaco incorporado ao longo de sete dias de ensaio. O comportamento de liberação da prata se

enquadrou melhor no modelo que combinou as equações de primeira ordem e Korsmeyer *et al.*(1983).

Dessa maneira, conclui-se que as membranas de quitosana e alginato contendo AlphaSan[®]RC2000 são biocompatíveis, quando umedecidas são anatômicas e possuem adequada capacidade de absorção de exsudatos. Além disso, apresentam baixa perda de massa quando em contato com fluidos similares aos corpóreos, o que indica que não precisam ser trocadas com frequência, diminuindo o trauma ocasionado pela troca do curativo, além de serem eficazes na redução da carga microbiana e favorecer a epitelização dos tecidos. Por meio dos testes de irritabilidade, citotoxicidade e sensibilização, foi possível garantir que o produto é seguro e apresenta elevado potencial para o uso em curativos.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuação deste trabalho, sugere-se:

- Confecção de membranas utilizando outros polímeros de grau farmacêutico e outras proporções poliméricas;
- A análise da citotoxicidade a fibroblastos, da sensibilização e irritabilidade dérmica e a eficácia antimicrobiana das membranas preparadas na presença de 2% de prata;
- O estudo das propriedades mecânicas de membranas úmidas;
- O estudo da cinética de liberação da prata e da atividade antimicrobiana com a membrana após a redução da prata;
- A avaliação de biocompatibilidade e atividade antimicrobiana da membrana *in vivo*;
- O estudo do aumento de escala do sistema de produção das membranas;
- Análise da viabilidade econômica de produção das membranas em larga escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, T. L. “Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico”; Dissertação de mestrado; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; Março de 2009.
2. AIBA, S. “Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan”. *International Journal Biological Macromolecules*, v.14, p. 225–228, 1992.
3. AIEDEH, K. M.; TAHA, M. O.; AL-HIARI, Y.; BUSTANJI, Y.; ALKHATIB, H. S. “Effect of ionic crosslinking on the drug release properties of chitosan diacetate matrices”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.96, n.1, 2007.
4. American Society for Testing and Materials ASTM D882-95a: *Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*, 1995.
5. American Society for Testing and Materials ASTM F895-84: *Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity*, 2006.
6. American Society for Testing and Materials ASTM G21-09: *Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi*, 1996.
7. AMS - Test method: LWILAB036. “Test methods for primary wound dressings – part 1: Aspects of absorbency”, 2002.
8. ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. “Functional Characterization of Chitin and Chitosan”. *Current Chemical Biology*, v.3, p. 203-230, 2009.
9. ATIYEH, B. S.; HAYEK, S. N.; GUNN, Q. W.; “New technologies for burn wound closure and healing - Review of the literature”. *Burns*, v.31; p. 944-956, 2005.

10. ATIYEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S. N.; DIBO, S.A. "Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature"; *Burns* v.33; p. 139-148, 2007.
11. AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F.M. "Quitina e quitosana, aplicações como biomateriais". *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p. 27-34, 2007.
12. BALAKRISHNAN, B.; MOHANTY, M.; UMASHANKAR, P. R.; JAYAKRISHNAN, A. "Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin". *Biomaterials*; v. 26, p. 6335–6342, 2005.
13. BALCERZAK, J.; MUCHA, M. "Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan". *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its derivatives*; p. 117-125, 2010.
14. BARTKOWIAK, A. "Effect of the ionic strength on properties of binary alginate/oligochitosan microcapsules". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.204, p. 117–124, 2002.
15. BEHAR, D.; JUSZYNSKI, M.; HUR, N. B.; GOLAN, J.; ELDAD, A.; TUCHMAN, Y.; STERENBERG, N.; RUDENSKY, B. "Omiderm, a new synthetic wound covering: Physical properties and drug permeability studies". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 20, p. 731-738, 1985.
16. BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. "Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p.35-52, 2004.
17. BERNABÉ, P.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONALL, W. "Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking". *Polymer Bulletin*, v. 55, p. 367-375, 2005.

18. BLANES, L. “Tratamento de feridas”. Baptista-Silva JCC Editor. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo, 2004.
19. BRYANT, R. A.; “Acute and chronic wounds: nursing management”. 2^a ed. St Louis: Mosby; p.105-63, 1992.
20. BUENO, C. Z.; “Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, maio de 2010.
21. CANADA, T. A.; SHUETTE, R. L.; STURM, R. C.; WIENCEK, I.; “Method for producing a silver-containing wound care device”. United States. US. Numero: 20050037058A1. 2003.
22. CARABALLO, I.; “Critical points in the formulation of pharmaceutical swellable controlled release dosage forms - Influence of particle size”; *Particuology*, v.7, p. 421–425, 2009.
23. CÁRDENAS, A.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F.; HIGUERA-CIAPARA, I.; PENICHE, C. “Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate”. *Macromolecular Bioscience*. v. 3, p. 535-539, 2003.
24. CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A; “Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films”; *Biomaterials*, v. 22, p. 261-268, 2001.
25. COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; “Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour mechanisms and optimal performance”. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. v.3, n.6, p. 198-204, 2000.
26. COSTA, P. “An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing”. *International Journal of Pharmaceutic.*, n. 220, p.77-83, 2001.
27. DALLAN, P. R. M. “Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele”; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; outubro de 2005.

28. DEALEY C. *The Care of Wounds*. Blackwell Science, Oxford, 1994.
29. DIBROV P.; DZIOBA J.; GOSINK K. K.; HASE, C. “Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of AgC in *Vibrio cholera*”; *Antimicrob Agents Chemother*, p. 2668-2670, 2002.
30. DOUGHTY, D. B. “Principles of wound healing and wound management”. Cap. 2. In: Bryant RA. *Acute and chronic wounds: nursing management*. St Louis: Mosby; p.31-68, 1992.
31. DUARTE, A. R. C.; SIMPLICIO, A. L.; VEGA-GONZÁLES, A.; SUBRA-PATERNAULT, P.; COIMBRA, P.; GIL, M.H.; SOUZA, H. C.; DUARTE, C. M. M. “Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery”; *Journal of Supercritical Fluids*, p. 373–377, 2007.
32. DUNN K.; EDWARDS-JONES V. “The role of Acticoat TM with nanocrystalline silver in the management of burns”. *Burn*, S1–9, 2004.
33. FERNÁNDEZ-HERVÁS, M. J.; FELL, J. T. “Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation”; *International Journal of Pharmaceutics*. v. 169, p. 115-119, 1998.
34. FERREIRA, E; LUCAS, R.; ROSSI, L. A.; ANDRADE, D.; “Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura”; *Revista da Escola de Enfermagem*. USP, 2003
35. FILGUEIRAS, C. A. L. “A espectroscopia e a química da descoberta de novos elementos ao limiar da teoria quântica”; *Química Nova na Escola*. n. 3, p. 22-25, 1996.
36. FMC BioPolymer. Alginates for pharmaceutical and medical applications. Disponível em: <http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/ISP/Content/Docs/Alginates%20for%20Pharmaceutical%20and%20Medical%20Applications.pdf>, 2008; [Acesso em Dez./2010]
37. FREEMAN, R.; BRADFORD, C.; CLARKE, R. “Wound dressings”; United States. US, número: 20070275043. 2007.

38. GARFEIN, E. S.; ORGILL, D.P.; PRIBAZ, J. J. “Clinical applications of tissue engineered constructs”. *Clinics in Plastic Surgery*. v. 30; p. 485–98, 2003.
39. GIBALDI, M.; FELDMAN, S. “Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations - theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms”. *Journal of Pharmaceutical Science*. 56, 1238–1242, 1967.
40. GIOVANAZZI, R. S. D. Uso do curativo bioativo em pacientes com feridas de origem multifatorial. Dissertação de mestrado; Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; Botucatu, 2009.
41. GLOBAL MARKET DIRECT. “*Global Biopolymers Market Analysis and Forecasts to 2015*”. Disponível em: <<http://www.prlog.org/10425492-global-biopolymers-market-analysis-and-forecasts-to-2015.pdf>>, Nov, 2009; [Acesso em Fev./2010].
42. GONZÁLES-RODRÍGUEZ, M. L.; HOLGADO, M. A.; SÁNCHEZ-LAFUENTE, C.; RABASCO, A. M.; FINI, A. “Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release”. *International Journal of Pharmaceutics*. v.232, p. 225-234, 2002.
43. GRASSI, M.; GRASSI, G.; “Mathematical Modelling and controlled drug delivery: matrix systems”; *Current Drug Delivery*, v.2, p. 97-116, 2005.
44. HAYNES, J.S.; TONER, L.; “Assessment and management of wound infection: the role of silver”; *Wound Care*, v.3, p.6-12, 2007.
45. HE, Q.; AO, Q.; WANG, A.; GONG Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. “*In Vitro* Cytotoxicity and Protein Drug Release Properties of Chitosan/Heparin Microspheres”. *Tsinghua Science & Technology*, v.12, p. 361-365, 2007.
46. HERMANS, M. H. “Silver-containing dressings and the need for evidence”. *Adv Skin Wound Care*. v. 20. p.166-73; 2007.
47. HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 50, p. 874-875, 1961.

48. HIGUCHI, T. "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Science*", v. 52, p. 1145-1149, 1963.
49. HIXSON, A.W., CROWELL, J.H.; "Dependence of reaction velocity upon surface and agitation". *Industrial Engineering Chemistry*. v.8, p. 923-931, 1931.
50. HOLLINGER, M. A. "Toxicological Aspects of Topical Silver Pharmaceuticals". *Critical Reviews in Toxicology*, p. 255-260, 1996.
51. HOWLING, G.I.; DETTMAR, P.W.; GODDARD, P.A.; HAMPSON, F.C.; DORNISH, M.; WOOD, E.J; "The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro". *Biomaterials.*, v. 22, p. 2959-2966, 2001.
52. HUGERTH, A.; CARM-LELHAM, N.; SUNDELO, L. O.; "The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan". *Polymer Journal*. v.34, p. 149-156, 1997.
53. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Manual da qualidade: ensaio de irritação cutânea primária. Número: 65.3330.003. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, p. 15, 2007.
54. IZUME, M.; NAGAE, S.; KAWAGISHI, H.; MITZUTOMI, M.; OHTAKARA, A. "Action pattern of *Bacillus* sp. no. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan"; *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 56, p. 448-453, 1992.
55. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 10ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 540 p. 2004.
56. KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. "Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing". *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3, p. 303-311, 2000.

57. KHOR, E.; LIM, L.Y. "Implantable applications of chitin and chitosan"; *Biomaterials*, v. 24, p. 2339–2349, 2003.
58. KIRSNER, R.S.; ORSTEAD, H.; WRIGHT, J. B. "Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role for nanocrystalline silver". *Wounds*, p. 5–12, 2001.
59. KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F.; MISTRY, J.; MIRAFATAB, M.; SMART, G.; GROOCOCK, M. R.; Williams, H. J. "Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings". *Carbohydrate Polymers*, v. 55, p. 65-76, 2004
60. KOBUBO, T.; KUSHITANI H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W", *Journal of Biomedical Materials. Research*, v .24, p. 721-734, 1990.
61. KRAYUKHINA, M. A.; SAMOILOVA, N. A.;YAMSKOV, I. A. "Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications". *Russian Chemical Reviews*. v. 77. p. 799 - 813, 2008.
62. KORSEMEYER, R.W.; GURNEY, R.; DOELKER, E. BURI, P.; PEPPAS, N.A. "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers". *International Journal of Pharmaceutics*. v. 15, p. 25-35, 1983.
63. KURITA, K. "Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans". *Marine Biotechnology*, v. 8, p. 203–226, 2006.
64. LANSDOWN, A. "Silver 2: toxicity in mammals and how its products aid wound repair". *"Journal of wound care"*.v.11. p. 173-177, 2002.
65. LAMKE L.O.; NILSSON, G.E.; REITHNER, H. L. "The evaporative water loss from burns and the water permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns". *Burns*.v.3. p.159–65, 1977.
66. LEAPER, D. J. "Wound dressings: their role in wound management". *International Wound Journal*, v.3, p.282-294, 2006.

67. LEE, A. C.; LEEM, H.; LEE, J.; PARK, K. C. "Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor". *Biomaterials*, v. 22, p. 4670–4676, 2005.
68. LI, Z.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D.; ZHANG, M. "Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*, v.26, p.: 3919–3928, 2005.
69. LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MAA, X. "Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes". *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, p. 1–6, 2008.
70. LÍMOVÁ, M. "Active Wound Coverings: Bioengineered Skin and Dermal Substitutes"; *Surgical Clinics of North America*, V. 90, p. 1237-1255, 2010.
71. LIONELLI, G. T.; LAWRENCE, W. T. "Wound dressings". *Surgical Clinics of North America*; v. 83, p. 617-638, 2003.
72. LOPES, C. M.; LOBO, J. M.; COSTA, P. "Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; v. 41, p. 143-153, 2005.
73. LYMAN, D.J. e ROWLAND, S.M. Biomaterials. In: KROSCWITZ, J. I. *Polymers: Biomaterials and Medical Applications*, p.52-71, 1989.
74. MALAFAYA, P.B.; SILVA, G.A.; REIS, R.L. "Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 207–233, 2007.
75. MALATERRE, V.; OGORKA, J.; LOGGIA, N.; GURNY, R. "Approach to design push–pull osmotic pumps"; *International Journal of Pharmaceutics*; v.376, p.56-62, 2009.
76. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. "Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I". *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78(4), p. 393-410, 2003.

77. MARINHO, A. M. “Atenção nos cuidados de enfermagem das escaras quanto às associações terapêuticas”. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v.50, p. 257-74, 1997.
78. AlphaSan[®] RC2000: Material Safety Data Sheet. p. 1-7, 2002. Disponível em: http://www.yesmsds.com/chemicals_supplier_gc/cas/msds/11631-3_ANTIMICROBIAL_ALPHASAN_RC_2000_12_7_2005_5_01_06_PM/index.as. [Acesso em 25/03/2010].
79. MAURSTAD, G.; MORCH, Y. A.; BAUSCH, A. R.; STOKKE, B. T. “Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate–chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy”. *Carbohydrate Polymers* 71, p. 672–681, 2008.
80. MCHUGH, D. J. “A guide to the seaweed industry”. FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/006/Y4765E/y4765e00.HTM>>,. 2003. Acesso em 25/03/2010.
81. MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; HE, C.; XING, N.; LI, L. “Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application”. *Journal of Material Science*. v. 21, p. 1751-1759, 2010.
82. MILLIKEN CHEMICAL. Disponível em <<http://www.milliken2.com/Chemical/chemdivp.nsf/KLWebKey/Alphasan~What%20is%20Alphasan~History%20of%20Silver?OpenDocument&SubSiteID=alphasan>>. Acesso em 04/05/2010.
83. MISHRA, A.; WHITAKER, I. S.; POTOKAR, T. S.; DICKSON, W. A. “The use of Aquacel-Ag[®] in the treatment of partial thickness burns: a national study”. *Burns*, v.33, p.679-680, 2007.
84. MONETTA L. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. *Revista Paulista de Enfermagem*, v. 3, p. 83-7, 1990.
85. MOURTAS, S.; FOTOPOULOU, S.; DURAJ, S.; SFIKA, V.; TSAKIROGLOU, C.; ANTIMISIARIS, S. G. “Liposomal drugs dispersed in hydrogels: Effect of liposome, drug

- and gel properties on drug release kinetics”; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; v.55, p. 212-221, 2007.
86. MÜLLER, G.; WINKLER, Y.; KRAMER, A. “Antibacterial activity and endotoxin-binding capacity of Actisorb® Silver 220”. *Journal of Hospital Infection*, v. 53, p. 211-214, 2003.
 87. MUZZARELLI, R.A.A. “Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients”; *Carbohydr. Polym.*, v. 20, p. 7-16, 1993.
 88. MUZZARELLI, R.; MATTIOLI-BELLMONTE, M.; TIETZ, C.; BIAGINI, R.; FERIOLLI, G.; BRUNELLI, M.A.; FINI, M.; GIARDINO, R.; ILARI, P.; BIAGINI, G. “Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan”. *Biomaterials*, v. 15, p. 1075-1081, 1994.
 89. NICNAS – National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. File No. STD/1081; 2004. Disponível em: <http://www.nicnas.gov.au/publications/CAR/new/Std/stdFULLR/std1000FR/std1081FR.pdf>.
 90. PAUL, D. R. “Elaborations on the Higuchi model for drug delivery”. *International Journal of Pharmaceutics*, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.037, 2010.
 91. PAUL, W.; SHARMA, C.P. “Chitosan and alginate wound dressings: a short review”. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v.18, p.18-23, 2004.
 92. PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSEL, D. “Bacterial resistance to silver in wound care”; *Journal of Hospital Infection*, p. 1-7, 2005.
 93. PEPPAS, N. A. “Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers”. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. v. 60, n. 110-1, p. 1985.
 94. PEPPAS, N.A.; SAHLIN, J.J. “A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation”. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 57, n. 2, p.169- 172, 1989.

95. PRADELLA, J.G.C. “Biopolímeros e intermediários químicos”. Relatório Técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP, 2006.
96. QIN, Y. “Silver-containing alginate fibres and dressings”. *International Wound Journal*; v.2, n.2 p.172—176, 2005.
97. QIN, Y.; ZHU, C.; CHEN, J.; ZHONG, J. “Preparation and Characterization of Silver Containing Chitosan Fibers”. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 104, p. 3622–3627, 2006.
98. QIN, Y. “Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management”. *Polymer International* v. 57, p.171–180, 2008.
99. RAVAL, A.; PARIKH, J.; ENGINEER, C. “Mechanism of controlled release kinetics from medical devices”. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v.27, p. 211-225, 2010.
100. RINAUDO, M. “Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials”. *Polymer International*, v. 57, p. 397–430, 2008.
101. RODRIGUES, A. P. “Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões”; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química; Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2008.
102. SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. “Reversed chitosanalginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65(2), p. 215-232, 2007.
103. SANTOS, V. L. C. G. “Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio”. In: Duarte YAO, Diogo MJD. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu; p.265-306, 2000.

- 104.SÆTHER, H.V.; HOLME, H.K.; MAURSTAD, G.; SMIDSRØD, O.; STOKKE, B.T.
“Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan”. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 813–821, 2008.
- 105.SHAMOV, M. V.; YU, S.; BRATSKAYA, AVRAMENKO, V. A. “Interaction of Carboxylic Acids with Chitosan: Effect of pK and Hydrocarbon Chain Length”. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.249, p. 316–321, 2002.
- 106.SIMSEK-EGE, F.A.; BOND, G.M.; STRINGER, J. “Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH”. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 88, p. 346-351, 2003.
- 107.STASHAK, T. S.; FARSTVEDT, E.; OTHIC, A. “Update on wound dressings: indications and best use”. *Clinical Techniques in Equine Practice*. v. 3, p. 148-163, 2004.
- 108.TAVAKOL, M.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; DOLATABADI-FARAHANI, T.; HASHEMI-NAJAFABADI, S.; “Sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan”. *Carbohydrate Polymers* v. 77, p. 326-330, 2009.
- 109.VEIGA, I. G; “Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, abril de 2009.
- 110.VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S. “Aplicações farmacêuticas de polímeros”. *Polímeros*, v.20, n.1, p. 51-64. 2010.
- 111.WAGNER, J.G.”Interpretation of percent dissolved–time plots derived from in vitro testing of conventional tablets and capsules”. *J. Pharm. Sci.* v.58, 1253–1257, 1969.
- 112.WANG, D. M.; WANG, C. Y.; CHU, C. Y.; YEH, H. M. “Permeation of drug and swelling agent through polymeric membranes”. *AIChE Journal*, v. 46(2), p. 2383-2394, 2000.

113. WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.Y. "Chitosan-alginate- CaCl_2 system for membrane coat application". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001.
114. WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L.Y. "Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing"; *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, p. 610-618, 2002.
115. WANG, Q.; DONG, Z.; DU, Y.; KENNEDY, J. F. "Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films". *Carbohydrate Polymers*, v. 69 (2), p. 336-343, 2007.
116. WARD, R.S., SAFFLE, J.R. "Topical agents in burn and wound care". *Physical Therapy*, v.75. p.526-38, 1995
117. WILLIAMS, W. "Pathophysiology of the burn wound". *Total Burn Care*, Saunders, London, 2ª edição. p.514-521, 2002.
118. WRIGHT, J.B.; LAM, K.; BURREL, R.E.; "Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment". *American Journal of Infection. Control*, p. 572-577, 1998.
119. YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L. Y; "PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates"; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48(7), p. 941-946, 2000.
120. YU, S.; MI, F.; WU, Y.; PENG, C.; SHYU, S.; HUANG, R.; "Antibacterial Activity of Chitosan-Alginate Sponges Incorporating Silver Sulfadiazine: Effect of Ladder-Loop Transition of Interpolyelectrolyte Complex and Ionic Crosslinking on the Antibiotic Release"; *Journal of Applied Polymer Science*, v. 98, 538-549, 2005.
121. YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I.; "Modern wound dressings: manufacturing and properties"; *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 40(2), p. 85-92, 2006.